NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

XPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

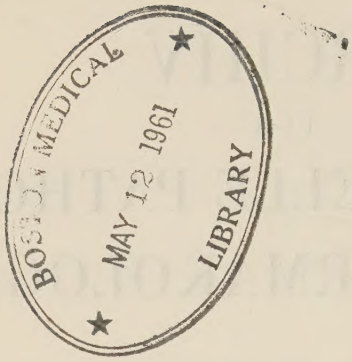
DR. P. HOLTZ
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

229. BAND

MIT 222 TEXTABBILDUNGEN

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956



Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.
Printed in Germany

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

Inhalt des 229. Bandes

Seite

Ankermann, H., Der Stoffwechsel im Erstickungsversuch unter Chlorpromazin und Regitin. Mit 3 Textabbildungen 476

Baier, H., K. H. Bässler und **K. Lang,** Über Wirkungen von Blei im Intermediärstoffwechsel 495

Bässler, K. H., s. **Baier, H.,** und **K. Lang**

—, und **K. Lang,** Zur Wirkung von Butazolidin im Intermediärstoffwechsel. Mit 1 Textabbildung 568

Benthe, H. F., Beitrag zur Beurteilung der antifibrillären Eigenschaft des Chinidins und ähnlich wirksamer Substanzen. Mit 4 Textabbildungen 82

—, Zur unblutigen Blutdruckmessung am freigelegten, nicht eröffneten Gefäß mit Rußkymographion-Registrierung. Mit 6 Textabbildungen 305

Betke, K., I. Greinacher und **F. Hecker,** Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Kaliumferricyanid. Mit 6 Textabbildungen 207

—, **I. Greinacher** und **O. Tietze,** Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Natriumnitrit. Mit 8 Textabbildungen 220

Brücke, F., H. Petsche, S. Sailer und **Ch. Stumpf,** EEG-Befunde bei Pseudoschmerzreflexen. Mit 2 Textabbildungen 408

Brunner, H., G. Kuschinsky, O. Münchow und **G. Peters,** Der Tag-Nacht-Rhythmus der Diurese, Elektrolytausscheidung und Clearance des echten endogenen Kreatinins bei der Ratte. Mit 2 Textabbildungen 482

Bubnoff, M. v., s. **Taugner, R., E. Schmid, H. Hochrein** und **F. Dorschner**

Bürger, H., s. **Rabe, H.-H.**

Büttner, H., s. **Portwich, F.**

Clodi, P. H., s. **Kraupp, O., H. Stormann** und **B. Pillat**

Della Bella, D., R. Villani und **G. F. Zuanazzi,** Über die curareähnliche Wirkung eines Disulfoniumabkömmlings, des Succinyl(bis)Sulfacholins. Mit 8 Textabbildungen 536

Dentzer, G., Zur Wirkungsspezifität von Komplexsalzen des Äthylendiamintetraessigsauren Natrium. Mit 2 Textabbildungen 161

Dorn, H., s. **Peters, K.,** und **W. Krais**

Dorschner, F., s. **Taugner, R., E. Schmid, M. v. Bubnoff** und **H. Hochrein**

Eber, O., und **F. Lembeck,** Über den enzymatischen Abbau der Substanz P. Mit 5 Textabbildungen 139

Ehrenstein, G. v., und **J. Frey,** Untersuchungen über intrarenale Vasomotorik der neugeborenen und jugendlichen Maus. Mit 3 Textabbildungen . . . 588

Eickstedt, K.-W. v., und **K.-P. Schaefer,** Das Verhalten der Körperstellreflexe bei der Steroidnarkose im Vergleich zur Evipan- und Inactinnarkose. Mit 4 Textabbildungen 556

Emrich, D., s. **Wöhler, F.**

Enders, A., und **A. Moench,** Silberelimination im Organismus bei experimenteller Argyrie. Mit 5 Textabbildungen 16

Erdmann, W. D., Versuche zur Deutung des sogenannten „Vulpian-Effektes" von Curarin. Mit 4 Textabbildungen 272

Fazekas, I. Gy., Mineralocorticoid in der Muskulatur bei normalen sowie hypertrophischen Nebennieren 152

Seite

Földes, I., s. **Komlós, E.**

Frey, J., s. **Ehrenstein, G. v.**

Friebel, H., und **C. Reichle**, Versuchstierart und Testergebnis bei Prüfung schmerz- und hustenstillender Arzneimittel 400

Friederici, L., Die Wirkung von Purinen, Prohepar, Hepanovin und Nucleotrat auf Knochenmarkskulturen. Mit 8 Textabbildungen 171

Gerstenberg, E., U. Wagenmann, E. Schmid und **R. Taugner**, Respiratorische Arrhytmie und respiratorische Blutdruckschwankung beim wachen Hund. Mit 5 Textabbildungen 520

Giertz, H., H. Goebels und **W. Rummel**, Über die Wirkung von Adenosin und Adenosinestern im Analgesietest an der Maus. Mit 3 Textabbildungen 26

—, **F. Hahn** und **A. Lange**, Über die Natur und Bildung von Rattenserumanaphylatoxin 366

Goebels, H., s. **Giertz, H.**, und **W. Rummel**

Greinacher, I., s. **Betke, K.**, und **F. Hecker**

—, s. **Betke, K.**, und **O. Tietze**

Gross, F., und **F. Sulser**, Wirkungsverstärkung von Renin und Nierenextrakt an der nierenlosen Ratte. Mit 6 Textabbildungen 338

—, und **F. Sulser**, Pressorische Substanzen in den Nieren experimentell hypertonischer Ratten. Mit 4 Textabbildungen 374

—, **P. Loustalot** und **F. Sulser**, Die Bedeutung von Kochsalz für den Cortexon-Hochdruck der Ratte und den Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen. Mit 3 Textabbildungen 381

Hagemann, U., Experimentelle Untersuchungen zur Morphologie toxisch wirkender Gaben von Methylthiouracil beim Meerschweinchen. Mit 7 Textabbildungen 52

Hahn, F., s. **Giertz, H.**, und **A. Lange**

Hecker, F., s. **Betke, K.**, und **I. Greinacher**

Heim, F., F. Leuschner und **A. Ott**, Der Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ferment- und Co-Enzym A-Aktivität der Leber 360

Herken, H., G. Senft und **H. Wilutzky**, Die Erzeugung von Natrium- und Wasserretentionen zur Prüfung der Diuretica. Mit 8 Textabbildungen . 123

Hochrein, H., s. **Taugner, R., E. Schmid, M. v. Bubnoff** und **F. Dorschner**

Holtz, P., und **H. J. Schümann**, Zur Frage spezifisch vagal-ganglionär blokkierender Wirkungen. Mit 7 Textabbildungen 101

—, und **H. W. Raudonat**, Über Beziehungen zwischen proteolytischer Aktivität und blutcoagulierender sowie bradykinin-freisetzender Wirkung von Schlangengiften. Mit 6 Textabbildungen 113

Jacobi, H., K. Pfleger und **W. Rummel**, Komplexbildner und aktiver Eisentransport durch die Darmwand. Mit 1 Textabbildung 198

Jung, F., J. Wendler und **B. Wiegershausen**, Über die Hämolyse durch seifenähnliche Substanzen. Mit 5 Textabbildungen 281

—, Optische Effekte bei Hämolyseversuchen. Mit 2 Textabbildungen . . . 293

Kaller, H., Pharmakologische Untersuchungen an der quergestreiften Augenmuskulatur der Ratte. Mit 5 Textabbildungen 297

Kraupp, O., H. Stormann, B. Pillat und **P. H. Clodi**, Kontraktionsverlauf und Kaliumfreisetzung durch Acetylcholin an der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Mit 6 Textabbildungen 419

Komlós, E., und **I. Földes**, Ausbildung bedingter Reflexe während Morphingewöhnung. Mit 1 Textabbildung 463

Krais, W., s. **Peters, K.**, und **H. Dorn**

Seite

Krause, D., und **D. Schmidtke-Ruhnau,** Der Antagonismus von Parasympathicolytica gegenüber der elektrischen Vagusreizung am Hunddarm. Mit 5 Textabbildungen 258

Krüskemper, H. L., und **G. Schulze,** Versuche zur Verhinderung der unter Cholinmangel entstehenden Fettleber durch Behandlung mit Fermenten des Fettstoffwechsels 34

Kuschinsky, G., und **E. Muscholl,** Die Wirkung von Theophyllin, Coffein und Theobromin auf Kontraktionskraft, Erregbarkeit, Refraktärzeit und Spontanfrequenz des isolierten Herzmuskels der Katze. Mit 4 Textabbildungen 348

—, s. **Brunner, H., O. Münchow** und **G. Peters**

Lang, H., und **K. Lang,** Über das Schicksal von C^{14}-Benzoesäure und C^{14}-p-Chlorbenzoesäure im Organismus. Mit 3 Textabbildungen 505

Lang, K., s. **Baier, H.,** und **K. H. Bässler**

—, s. **Lang, H.**

—, s. **Bässler, K. H.**

Lange, A., s. **Giertz, H.,** und **F. Hahn**

Lembeck, F., s. **Eber, O.**

Leuschner, F., s. **Heim, F.,** und **A. Ott**

Lindaur, V., Zur Frage des Einflusses von Chlorpromacin auf den Blutzucker 253

Loustalot, P., s. **Gross, F.,** und **F. Sulser**

Markwardt, F., Untersuchungen über den Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Hirudins. Mit 4 Textabbildungen 389

Matthies, H., Methämoglobinrückbildung in Reticulocyten. Mit 2 Textabbildungen 331

—, **B. Wiegershausen, G. Otto** und **G. Scholz,** Pharmakologische Untersuchungen an Interoreceptoren. Mit 8 Textabbildungen 544

Meyer-Wilmes, J., und **H. Remmer,** Die Standardisierung des roten Blutfarbstoffes durch Hämiglobincyanid. I. Mitteilung: Bestimmung der spezifischen Extinktion von Hämiglobincyanid 441

Moench, A., s. **Enders, A.**

—, und **K. Rother,** Monophasische Immunpathogenese der experimentellen Nephritis-Nephrose bei Jungtieren. Mit 2 Textabbildungen 469

Münchow, O., s. **Brunner, H., G. Kuschinsky** und **G. Peters**

Muscholl, E., s. **Kuschinsky, G.**

Ott, A., s. **Heim, F.,** und **F. Leuschner**

Otto, G., s. **Matthies, H., B. Wiegershausen** und **G. Scholz**

Peters, G., s. **Brunner, H., G. Kuschinsky** und **O. Münchow**

Peters, K., W. Krais und **H. Dorn,** Zur Wirkung von Megaphen auf die Rattenleber nach Schädigung durch Buttergelb. Mit 7 Textabbildungen 182

Petsche, H., s. **Brücke, H., S. Sailer** und **Ch. Stumpf**

Pfleger, K., s. **Jacobi, H.,** und **W. Rummel**

Pillat, B., s. **Kraupp, O., H. Stormann** und **P. H. Clodi**

Portwich, F., und **H. Büttner,** Sulfonamidkonzentrationen im Serum nach Verabreichung kombinierter Sulfonamide. Mit 4 Textabbildungen . . 75

—, und **H. Büttner,** Über die Beeinflussung der Tubulusfunktion bei der Nierenausscheidung des 4-Sulfanilamido-2,6-dimethyl-pyrimidins . . . 513

Rabe, H.-H., und **H. Bürger,** Serumeiweißuntersuchungen mit Papierelektrophorese beim gesunden Meerschweinchen und nach Infektion mit virulenten und virulenzgeschwächten, humanen Tuberkelbakterien. Mit 8 Textabbildungen 316

Rašková, H., s. **Vaněček, J.**

—, und **J. Vaněček,** Wirkungen des Streptolysin O auf bedingte Reflexe. Mit 2 Textabbildungen 7

Seite

Raudonat, H. W., s. **Holtz, P.**
Reichle, C., s. **Friebel, H.**
Reiter, M., Die Wirkung von Adrenalin, Veratramin und Chinidin auf die Reizbildung im Herzen. Mit 5 Textabbildungen 233
Remmer, H., s. **Meyer-Wilmes, J.**
—, Die Standardisierung des roten Blutfarbstoffes durch Hämiglobincyanid. II. Mitteilung: Eisengehalt und O_2-Bindungsvermögen von menschlichem Blut. Mit 1 Textabbildung 450
Rother, K., s. **Moench, A.**
Rummel, W., s. **Giertz, H.**, und **H. Goebels**
—, s. **Jacobi, H.**, und **K. Pfleger**
Schaefer, K.-P., s. **Eickstedt, K.-W. v.**
Schaumann, W., Verminderung des Wirksamkeitsunterschiedes optischer Isomere mit steigender Konzentration. Mit 6 Textabbildungen 41
—, Pharmakologische Beeinflussung der Erregungsleitung am Darm. Mit 5 Textabbildungen 432
Schmid, E., s. **Taugner, R., M. v. Bubnoff, H. Hochrein** und **F. Dorschner**
—, s. **Gerstenberg, E., U. Wagenmann** und **R. Taugner**
Schmidt, G., Vorkommen und Ausscheidung von α-Äthyl-α-Oxybuttersäure nach Adalinaufnahme. Mit 2 Textabbildungen 67
Schmidtke-Ruhnau, D., s. **Krause, D.**
Scholz, G., s. **Matthies, H., B. Wiegershausen** und **G. Otto**
Schreier, K., E. Zöller und **B. Vira-Wissarianow**, Einfluß von Cytostatica auf Einbau von Lysin in Gewebsproteine 167
Schümann, H. J., s. **Holtz, P.**
Schulze, G., s. **Krüskemper, H. L.**
Sailer, S., s. **Brücke, F., H. Petsche** und **Ch. Stumpf**
Senft, G., s. **Herken, H.**, und **H. Wilutzky**
Stormann, H., s. **Kraupp, O., B. Pillat** und **P. H. Clodi**
Stumpf, Ch., s. **Brücke, F., H. Petsche** und **S. Sailer**
Sulser, F., s. **Gross, F.**
—, s. **Gross, F.**, und **P. Loustalot**
Taugner, R., E. Schmid, M. v. Bubnoff, H. Hochrein und **F. Dorschner**, Zur Frage des tubulären Maximums der Orthophosphatrücksorbtion. Mit 3 Textabbildungen 242
—, s. **Gerstenberg, E., U. Wagenmann** und **E. Schmid**
—, **E. Schmid, M. v. Bubnoff, H. Hochrein** und **F. Dorschner**, Renale Phosphatausscheidung bei Infusion von Fructosediphosphat am Hund. Mit 4 Textabbildungen 580
Vaněček, J., und **H. Rašková**, Wirkungen von Streptolysin 0 auf die Chemoreceptoren. Mit 3 Textabbildungen 1
—, s. **Rašková, H.**
Villani, R., s. **Della Bella, D.**, und **G. F. Zuanazzi**
Vira-Wissarianow, B., s. **Schreier, K.**, und **E. Zöller**
Wagenmann, U., s. **Gerstenberg, E., E. Schmid** und **R. Taugner**
Wendler, J., s. **Jung, F.**, und **B. Wiegershausen**
Wiegershausen, B., s. **Jung, F.**, und **J. Wendler**
—, s. **Matthies, H., G. Otto** und **G. Scholz**
Wilutzky, H., s. **Herken, H.**, und **G. Senft**
Wöhler, F., und **D. Emrich**, Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kobaltwirkung auf den Eisenstoffwechsel (Speichereisen). Mit 4 Textabbildungen 92
Zetler, G., Wirkungsunterschied zwischen den Polypeptiden, Bradykinin und Substanz P am Zentralnervensystem 148
Zöller, E., s. **Schreier, K.**, und **B. Vira-Wissarianow**
Zuanazzi, G. F., s. **Della Bella, D.**, und **R. Villani**

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 1—6 (1956)

Pharmakologische Katheder der kinderärztlichen Fakultät der Karlsuniversität Prag
(Vorstand: doc. MUDR H. RAŠKOVÁ)

Wirkungen von Streptolysin O auf die Chemoreceptoren

Von

JIŘÍ VANĚČEK und HELENA RAŠKOVÁ

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Januar 1956)

Die Zahl der Arbeiten, welche den pathophysiologischen Wirkungen der bakteriellen Toxine im Organismus gewidmet ist, ist verhältnismäßig gering. Ein Teil des Schrifttums, die Endotoxine betreffend, wurde in letzter Zeit von THOMAS resümiert. In unserem Institut wurde bisher besonders die Wirkung des Shigella Shigae Toxins und des Endotoxin S. typhi im Organismus untersucht (RAŠKOVÁ u. Mitarb. 1950, 1952, 1953).

Von besonderem Interesse scheinen uns die Streptokokkengifte, besonders das Streptolysin O. Es ist allgemein bekannt, daß diesem Gifte bzw. dem Antistreptolysintiter im Blute von Rheumatikern eine gewisse Rolle zugesprochen wird. Arbeiten aus letzter Zeit (RAŠKA u. ROTTA) zeigen seine Wichtigkeit beim Entstehen von experimentellen Rheumatismus.

Über die pharmakodynamischen Wirkungen des Streptolysin O im Organismus gibt es in der Literatur nur wenig Arbeiten. Bekannt sind hauptsächlich die Befunde BERNHEIMERS und CANTONIS über die Wirkungen des Giftes auf das isolierte Froschherz, wo es zur Freisetzung einer hemmenden Substanz führt. Unsere Mitarbeiter HÁVA, MRÁZ und SYRŮČEK befaßten sich eingehend mit der Dynamik der durch Streptolysin O hervorgerufenen Hämolyse in vivo, ihrem Mechanismus und der Beeinflußbarkeit durch Pharmaka. Einer von uns befaßte sich auch eingehend mit der Wirkung von Streptolysin O auf das Warmblüterherz.

Besonders wenig Arbeiten finden wir über die Affinität von Toxinen zum Nervensystem, bis auf Toxine, deren primäre Neuroaffinität offensichtlich ist (Tetanus-, Botulinustoxin). Die wenigen diesbezüglichen Arbeiten, welche hauptsächlich Toxine der gramnegativen Gruppe betreffen (REILLY 1936, ADO 1952, PENNER u. KLEIN 1952, RAŠKOVÁ 1952, 1953) sind so interessant, daß sie uns zu der Frage nach der Wirkung des Streptolysin O auf verschiedene Teile des Nervensystems führte.

In dieser Arbeit fassen wir unsere Resultate über die Wirkung des Streptolysin O auf die Chemoreceptoren im Sinus caroticus und in den Dünndarm und Nieren versorgenden Arterien zusammen.

Methoden und Material

Die Wirkung des Streptolysin O auf die Chemoreceptoren wurde an 38 Kaninchen und 78 Katzen geprüft.

Der Sinus caroticus wurde nach der modifizierten Methode von Heymans isoliert und durch die A. carotis communis mit Tyrodeflüssigkeit bei 37° C perfundiert. Bei anderen Tieren wurde ein Ast der A. mesenterialis superior oder der A. renalis bei erhaltenen nervösen Verbindungen humoral isoliert und mit 37° C warmer Tyrodelösung perfundiert (nach Tcshernigowskij). Die Kanüle wurde in den isolierten Ast der A. mesenterica superior bzw. renalis eingeführt. Die Ausflußkanülen wurden in eine der außerhalb des Sinus caroticus unterbundenen Arterien (meistens in die A. lingualis), bzw. in den bezüglichen Ast der Vena mesenterica superior bzw. renalis eingebunden.

Die humorale Isolation des Gebietes wurde einerseits nach der Farblösigkeit der abfließenden Flüssigkeit, anderseits mittels Methylenblauinjektion kontrolliert.

Als Reiz für die Chemoreceptoren wurden 30 μg Acetylcholin und 0,2 ml isotonischer KCl-Lösung benutzt. Die Lösungen (Acetylcholin in 0,3 ml physiologischer NaCl-Lösung) wurden in den afferenten Ast des Perfusionskreises injiziert. Reflektorische Veränderungen von Blutdruck wurden vermittels eines Quecksilbermanometers aus der A. carotis oder A. femoralis registriert. Die Atmung wurde aus der Trachea über eine Mareykapsel auf das berußte Kymographion übertragen.

Um eventuelle pressoreceptorische Veränderungen bei den Versuchen auszuschließen, wurde immer mit physiologischer Kochsalzlösung nachgeprüft. Ein automatischer Injektionsapparat ermöglichte Injektionen bei gleichem Druck und gleicher Geschwindigkeit.

Wir injizierten erst einigemal Acetylcholin allein oder alternierend mit Kaliumchlorid in Abständen von 10 min. Dann wurde in den afferenten Ast des Perfusionskreises 0,5 ml Streptolysin O injiziert. Das Gift wurde von Dr. Syrůček und Dr. Rotta im Institut für Epidemiologie und Mikrobiologie hergestellt, enthielt 160—200 UA in 1 Ampulle. Die Vorbereitung wurde in einer anderen Arbeit beschrieben (Háva u. Syrůček 1953). Das Gift bekamen wir in lyophilisierter Form. Wir lösten den Inhalt einer Ampulle in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung.

In 10 Minutenabständen wurde dann wieder Acetylcholin bzw. KCl in denselben Dosen gespritzt.

Die Präparation wurde bei Kaninchen in Urethannarkose (1—1,25 g/kg) und bei Katzen in Chloralose-Luminalanästhesie (0,06 und 0,04 g/kg) oder Ch. Urethan unternommen.

Ein Teil der Tiere bekam während des Versuches Streptolysin O zum erstenmal, einem Teil der Tiere wurde Streptolysin O 24 oder 48 Std, einem anderen 21 Tage vorher intraperitoneal (10 UA) verabreicht.

Versuchsergebnisse

Bei den meisten Tieren, welche während des Versuches zum ersten Male Streptolysin O bekamen, sahen wir keine Veränderungen von Blutdruck und Atmung. Auch die Acetylcholin- bzw. KCl-Reaktion blieb

unverändert. In einem Teil der Versuche verursachte das Gift auf eine kurze Zeit eine Blockade der Acetylcholinreaktion. Ausnahmsweise sahen wir nach dem Gift selbst eine Blutdruckveränderung reflektorischen Charakters (Abb. 1).

Auch bei Tieren, welche das Gift 1—2 Tage vorher intraperitoneal erhalten hatten, kam es nach der Applikation des Giftes in den

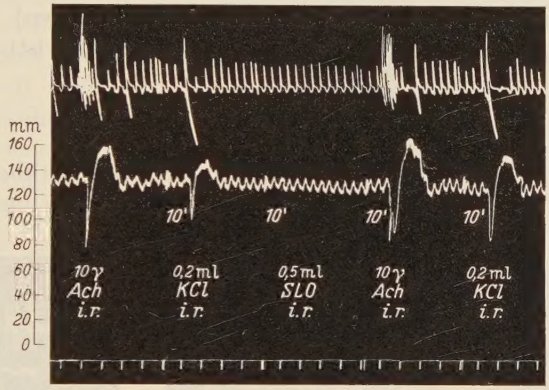


Abb. 1. 13. VII. 1954. Katze 2 kg. Narkose: Chloralose 40 mg/kg + Urethan 200mg/kg in 10 ml physiologischer Lösung intraperitoneal. Linke Niere humoral isoliert, Perfusion mit Ringer-Locke 38° C. Von oben nach unten: Atmung, Blutdruck, Zeit in Minuten. KCl-Kaliumchlorid-isotonische Lösung. Ach-Acetylcholin, SLO-Streptolysin 0—120 UA/ml. i.r. — Applikation in den Perfusionskreis der Niere

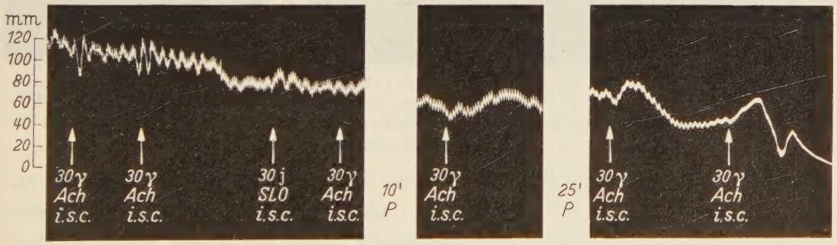


Abb. 2. Katze, 1650 g, Narkose: Chloralose 80 mg/kg intraperitoneal. Registrierung des Blutdrucks. 1 Tag vorher bekam das Tier 10 E Streptolysin O intraperitoneal. Perfusion des rechten Sinus caroticus mit Ringer-Locke 38° C. Ach-Acetylcholin, SLO-Streptolysin O, ISC-Applikation in den afferenten Ast des Perfusionskreises

Perfusionskreis kaum zu solchen Veränderungen des Blutdruckes. Die Reaktion auf Acetylcholin ist auf längere Zeit blockiert und kehrt dann in paradoxer Weise wieder zurück. Nach wiederholter Applikation von Acetylcholin wird die Reaktion größer und endet mit einer Kreislaufkrisis, von welcher sich die Tiere meistens nicht erholen (Abb. 2).

Noch interessanter waren die Versuchsergebnisse, wenn die Tiere drei Wochen vorher drei Tage nacheinander 10—20 UA von Streptolysin O subcutan erhalten hatten. Bei diesen Tieren sahen wir regelmäßig

nach der Injektion von 40 UA Streptolysin O in den afferenten Ast des Perfusionskreises reflektorische Veränderungen des Blutdruckes. Die Acetylcholinreaktion war hier nicht blockiert, sondern oft umgekehrt. Nach wiederholten Gaben von Acetylcholin und einer weiteren Streptolysin O-Applikation kam es zu schweren Circulationsstörungen reflektorischen Charakters (Abb. 3).

In Kontrollversuchen mit Kalbbouillon (auf dem die Streptokokken, von denen das Streptolysin O stammte, gezüchtet wurden), fanden wir keine Veränderungen, lediglich manchmal eine ganz kurzfristige Blockade der Acetylcholinreaktion.

Diskussion

Mit der Frage, ob die von uns erzielten Resultate wirklich nervösen Mechanismen zugeschrieben werden können, befaßten wir uns in anderen

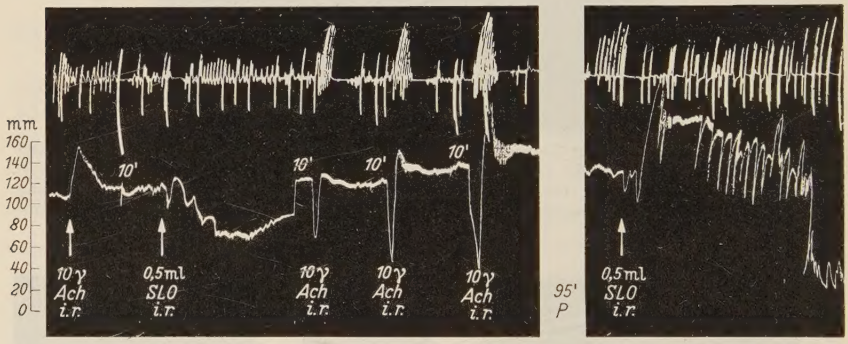


Abb. 3. Versuch 22. VI. 1954. Katze, 2300 g Narkose: Chloralose + Urethan wie sub. 1. Perfusion der isolierten Niere wie sub. 1. Von oben nach unten: Atmung, Blutdruck. Ach-Acetylcholin, SLO-Streptolysin O, Applikation in den Perfusionskreis. Das Tier bekam 21 Tage vorher 0,1 Streptolysin i.p.

Arbeiten (Rašková, Kratochvílová u. Mitarb., Vaněček, Küchel u. Mitarb.). Es zeigte sich, daß etwa 1 : 1000 bis 1 : 10000 der Isotopenmenge, welche in ein humoral isoliertes Gebiet appliziert wird, in den Organismus durchdringt. Durch Kontrollversuche mit entsprechenden Dosen von Toxin, Acetylcholin und anderen Pharmaka konnten wir beweisen, daß es sich tatsächlich um nervöse Reaktionen handelt, da die entsprechenden kleinen Mengen der Stoffe, in die Jugularvene injiziert, keine Veränderungen des Blutdruckes und der Atmung verursachten. So wie es einer von uns schon mit dem Shigella Shigae-Toxin und dem Typhus-Toxin bewiesen hat, beeinflußt auch Streptolysin O die Receptoren, und zwar nicht nur im Sinus caroticus, sondern auch in anderen Arterien (A. renalis, A. mesenterica sup., A. auricularis posterior). Aus den Arbeiten Bykovs u. Mitarb. wissen wir, daß reflektorische Veränderungen nicht nur bei der Reizung der Chemoreceptoren im Sinus

caroticus, wie es seit HEYMANS Entdeckung bekannt ist, zustandekommen, sondern daß Chemoreceptoren auch in anderen Gebieten vorhanden sind. Diese, sowie unsere vorhergehenden Arbeiten zeigen, daß die Ansprechbarkeit dieser Receptoren auf Acetylcholin und Kaliumchlorid, die heute schon klassischen Reizmittel der Chemoreceptoren sind, durch Toxine bedeutend verändert wird. Streptolysin O verändert bei der ersten Applikation diese Reaktionen nur wenig, bei mit Streptolysin O vorbehandelten Tieren kommt es aber zu Veränderungen, welche von der Zeitspanne zwischen Sensibilisierung und dem eigentlichen Versuch abhängig sind.

Die Umkehr der Reaktion auf Acetylcholin sahen wir auch nach anderen Toxinen; sie ist ein Indicator der veränderten Reaktionsfähigkeit. Auch die Reaktion der Receptoren auf Streptolysin O ist davon abhängig, ob das Tier schon mit dem Gifte in Berührung kam. Diese sekundäre Sensibilisierung der Chemoreceptoren für das Gift stimmt mit ADOS und unseren eigenen Erfahrungen mit Typhus-Toxin überein. Die schweren Circulationskrisen nervösen Ursprungs, die wir bei unseren Versuchen mit Streptolysin O sowie früher mit Typhus-Toxin sahen, scheinen uns einen gewissen Hinweis auf den Ursprung von akuten Circulationsstörungen, welche vielen Infektionskrankheiten gemein sind, zu geben. Die Beeinflussung der Chemoreceptoren bei der Circulation von größeren Mengen des Toxins im Organismus mag bei Infektionen nicht ohne Wichtigkeit sein. Da es sich um Reaktionen handelt, welche bei verschiedenen Toxinen ähnlich sind, kann man schwer sagen, es handle sich um spezifische Vorgänge. Die verschiedene Wirkung des Giftes hängt davon ab, ob und wann der Organismus vorher mit ihm in Berührung kam.

Zusammenfassung

Streptolysin O verursacht Veränderungen an Chemoreceptoren verschiedener Gebiete.

Wenn ein Tier zum ersten Male mit dem Gift in Berührung kommt, verursacht dieses keine Veränderungen des Blutdruckes, blockiert aber öfters auf kürzere Zeit die sonst regelmäßig vorkommenden reflektorischen Blutdruckänderungen nach Acetylcholin und Kaliumchloridreiz. Bei wiederholter Applikation des Toxins verursacht es selbst Reflex-Reaktionen und erhöht die Wirkung von Acetylcholin; es kommt zu schweren reflektorischen Circulationsstörungen. Ähnliche Befunde wurden auch mit anderen bakteriellen Giften erhoben.

Literatur

ADO, A. D.: Die Antigene als Reize des zentralen Nervensystems. Moskau: Medgiz 1952. — BERNHEIMER, A. W., und G. L. CANTONI: J. of Exper. Med. **86**, 193 (1947). — BYKOV, K. M.: Die Großhirnrinde und die inneren Organe. Moskau: Medgiz

1947. — Cantoni, G. L., and Bernheimer, A. W.: J. of Exper. Med. **81**, 307 (1945). — J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **91**, 31 (1947). — Háva, M., L. Syrůček u. H. Rašková: Fol. haemat. (Lpz) **73**, 4 (1956. — Háva, M., u. M. Mráz: Československá epidemiologie a mikrobiologie **5**, 26 (1956). — Penner, A., und S. H. Klein: J. of Exper. Med **96**, 59 (1952). — Raška, K., Rotta, J. u. J. Bednář: Schweiz. Ztschr. Pathol. u. Bakter. **19**, 205 (1956). — Rašková, H., u. Mitarb.: Čas. lék. čes. **89**, 1248 (1950); **91**, 61 (1952); **91**, 1348 (1952). — Rašková, u. Mitarb.: Hygiena, epidemiologie, mikrobiologie **2**, 44 (1953). — Rašková, H., V. Kratochvílová u. Mitarb.: Hyg. epid. mikrob. **4**, 1 (1955). — Reilly, J., E. Rivalier u. Mitarb.: Ann. Med. **37**, 21 (1935). — Thomas, L.: Annual. Rev. Physiol. **16**, 467 (1954). — Vaněček, J., O. Küchel, S. Röhling u. S. Vohnout: Čas. lék. čes. im Druck.

Dozent Dr. Helena Rašková, Prag II. (ČSR), Albertov 4, Pharmakol. Katheder d. kinderärztl. Fakultät d. Karlsuniversität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 7—15 (1956)

Pharmakologische Katheder der kinderärztlichen Fakultät
der Karlsuniversität in Prag
(Vorstand: doc. Mudr H. Rašková)

Wirkungen des Streptolysin O auf bedingte Reflexe

Von
Helena Rašková und Jiří Vaněček

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Februar 1956)

In unserer früheren Mitteilung zeigten wir[24], daß das Streptokokkengift Streptolysin O bei mit diesem Gifte vorbehandelten Tieren die Reaktionslage der Chemoreceptoren verändert. Wir stellten bei vorbehandelten Tieren einerseits durch das Gift verursachte reflektorische Veränderungen des Blutdruckes fest, andererseits Veränderungen der reflektorischen Blutdruckwirkungen, welche durch die Reizung von Chemoreceptoren mit Acetylcholin zustande kommen. Nach vorhergehender Injektion von Streptolysin O in humoral isolierte Perfusionskreise, z. B. in den isolierten Sinus caroticus, kam es bei wiederholter Applikation von kleinen Acetylcholindosen (10—30 μg) zu immer größeren reflektorischen Blutdruckveränderungen, welche mitunter als schwere Zirkulationskrisen endeten. Es schien uns interessant zu untersuchen, ob Streptolysin O auch Veränderungen der höheren Nerventätigkeit (bedingte Reflexe) verursacht. Einige Toxine, nicht aber das Streptolysin O, wurden in dieser Hinsicht besonders von sowjetischen Autoren geprüft (Goršeleva[9], Chozak u. a.[6]). Mit den von ihnen benutzten hohen, subletalen Dosen sahen sie nicht nur schwere, wochenlang andauernde Hemmungen der höheren Nerventätigkeit, sondern auch langdauernde allgemeine Intoxikationserscheinungen.

Wir wollten dagegen die Wirkungen des Giftes in solchen Dosen prüfen, die praktisch ungiftig sind bzw. das Verhalten der Tiere nicht verändern. Es schien uns auch interessant festzustellen, wie sich die Verhältnisse nach wiederholter Giftzufuhr verändern und ob die beobachteten Veränderungen spezifischer Natur sind. Die kleinen Dosen des Giftes entsprechen den natürlichen Verhältnissen bei Streptokokkeninfektionen eher.

Da bedingte Reflexe bei Ratten relativ leicht ausgearbeitet werden können, wählten wir diese Tierart, welche zudem mit einer größeren Zahl von Versuchstieren zu arbeiten erlaubt.

Methoden und Material

1. Zur Ausarbeitung der bedingten Reflexe wurden Ratten im Gewicht von 200 g unter konstanten Bedingungen in kleinen Einzelbehältern bei 22° C gehalten und mit der Diät nach Larsen gefüttert. Die Tiere wurden täglich gewogen. Aus größeren Gruppen gelang es im ganzen bei 20 Tieren die bedingten Reflexe so fest auszuarbeiten, daß sie für die weiteren Versuche brauchbar waren.

Wir benutzten die Methode von Kotljarevskij zur Ausbildung bedingter Futterreflexe. Prinzipiell handelt es sich darum, daß Ratten durch das Öffnen einer Flügeltür zu Futter gelangen. Wenn die Futtergabe (wir verwendeten pro Dosis ein halbes gekochtes Kukurutzkorn) mit indifferenten Signalen verbunden wird (wir gebrauchten zuerst ein Glockensignal, zu dem wir später ein Lichtsignal zufügten), kommt es verhältnismäßig bald zum Öffnen der Tür auf das Signal. Der Türspalt (die Ratte öffnet die Tür mit dem Kopf) wird gemessen und so die Intensität des Reflexes ausgedrückt. Das Signal dauert 10 sec und die Zeitspanne, bis die Ratte die Tür öffnet, ergibt die Latenzzeit. Wir maßen auch alle spontanen Türöffnungen zwischen den einzelnen Signalen, welche die sogenannten Intersignalreaktionen ergeben. Die Reflexe wurden dann so ausgearbeitet, daß die Verstärkung mit Futter erst 4 sec nach dem Anfang des Signales erfolgte. Nachdem beide positiven Reflexe fest ausgebildet waren, wurde ein negatives Signal eingeschaltet (wir benutzten einen Summer). Das heißt, hier wurde nie mit Futter verstärkt, so daß nach einer Reihe von Verbindungen die Ratten auf dieses Signal die Tür nicht mehr öffneten. Bei 12 von 20 Ratten gelang es uns, den ganzen beschriebenen Komplex der bedingten Reflexe auszuarbeiten, bei 8 Ratten begnügten wir uns mit 2 festen positiven bedingten Reflexen. Als fest betrachteten wir die bedingten Reflexe dann, wenn es während 5 Sitzungen zu keiner Fehlleistung kam. Dies bedeutet für den kompletten Stereotyp mindestens 2 Monate Arbeit. Die Tiere wurden täglich zu gleichen Stunden des Tages geübt (außer Sonntag).

Die Signale wurden in Intervallen von 2—3 min gegeben. Die Experimente wurden mit 2 Gruppen von Tieren vorgenommen. In der *ersten* Gruppe waren 8 Tiere und zur Ausarbeitung des Stereotyp wurde für die täglichen Sitzungen das folgende Schema gewählt:

G G L L G S G G L L

G = Glocke, *L* = Licht, *S* = Summer. (Im ganzen also 10 Signale im Intervall von 2—3 min.)

In der *zweiten* Gruppe waren 12 Tiere. Bei 4 wurde der ganze Stereotyp ausgearbeitet, bei 8 war die Differenziation noch nicht ganz fest. Darum wurden nur die beiden positiven bedingten Reflexe während der Versuche beurteilt. In dieser Gruppe benutzten wir die folgende Reihenfolge der Signale in 2—3 min Intervallen:

G G L L G S S G L L G G

(Im ganzen also 12 Signale pro Sitzung.)

2. *Streptolysin O* stellte uns Dr. J. Rotta aus dem Institut für Epidemiologie und Mikrobiologie in Prag zur Verfügung. Das Gift wurde folgendermaßen erzeugt: Ein Filtrat einer 18 Std alten Kultur des hämolytischen Streptokokken Typ A wurde mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Das Präcipitat wurde in Phosphatpufferlösung gelöst und gegen fließendes Wasser dialysiert. Mit NaCl wurde eine für Erythrocyten isotonische Lösung bereitet.

Die Lösung wurde filtriert und vermittels eines Seitz-Filters entkeimt. Mit saurem $Na_2S_2O_3$ wurde die Lösung reduziert und unter Vakuum in Ampullen gefüllt. Die hämolytischen Einheiten wurden mit Antistreptolysinstandard festgestellt.

Zu den Versuchen mit der ersten Tiergruppe (1954) wurde eine Charge benutzt, die 40 UA Streptolysin pro Milliliter enthielt, und deren Giftigkeit, in LD_{50} ausgedrückt, 0,4 ml · 10^{-2} pro 20 g Maus bei i.v. Applikation betrug. Die zweite Tiergruppe (1955) wurde mit einer Streptolysincharge behandelt, die 120 UA/ml enthielt, jedoch weniger giftig war, da die Mäuse nach 1 ml · 10^{-2} nur ausnahmsweise starben.

Da wir aus früheren Versuchen wußten, daß Adenosintriphosphorsäure die Wirkungen von Acetylcholin auf das Nervensystem vergrößert und in kleinen Dosen zu einer Enthemmung der Differenziation führt (Rašková 1952—1955), benutzten wir in einigen Fällen das Natriumsalz von ATP, um Veränderungen der höheren Nerventätigkeit zu beeinflussen.

Wir gebrauchten ferner zu unseren Versuchen das Endotoxin der *Salmonella typhi abdominalis*, welches uns Dr. Věra Matějovska aus dem Institut für Epidemiologie und Mikrobiologie in Prag zur Verfügung stellte. Die Bereitung des Giftes aus einer 24 Std-Kultur der S. typhi abd. wurde schon eingehend beschrieben (Rašková, Raška, Matějovská u. Rybová 1953[19]). Das Gift stand uns in lyophilisierter Form zu Verfügung. Jede Ampulle enthielt etwa 0,01 getrocknetes Toxin. Die LD_{50} des Giftes betrug 0,4 ml $3 \cdot 10^{-4}$ auf 20 g Maus bei intraperitonealer Verabreichung.

Die Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt:

Gruppe I. Die Tiere bekamen 0,1 ml Streptolysin 0/100 g Gewicht intraperitoneal (unverdünnt). 30 min nach der Applikation wurde die erste Sitzung, nach 6 Std die zweite und nach 24 Std die dritte durchgeführt; dann wurden die Tiere täglich in den Versuch genommen. Nach 21 Tagen wurde die Verabreichung des Giftes in derselben Weise wiederholt. Zur dritten Verabreichung kam es nach weiteren 5 Tagen. Diesmal erfolgte die Verabreichung des Giftes zusammen mit einer i.v. Injektion von 1 mg/kg ATP. Die Dosis von Streptolysin wurde nun auf 0,2 ml/100 g erhöht und blieb auch bei den weiteren 3 Applikationen, welche in dreitägigen Intervallen folgten, auf dieser Höhe. Der Versuch wurde in einem dreitägigen Abstand nach der letzten Streptolysin O-Verabreichung mit einer intraperitonealen Injektion von Typhustoxin 0,2 ml/100 g · 10^{-3} beendet.

Gruppe II. Die Tiere wurden zu 6 in 2 Versuchen benutzt.

Gruppe II a. Die Versuchsanordnung war hier so, daß in 3tägigen Intervallen 3mal Streptolysin O in Dosen wie oben angeführt, verabreicht wurde, dann in denselben Zeitintervallen zweimal das Typhusendotoxin. Nach der Verabreichung der Gifte wurde die Sitzung nach 2 Std durchgeführt, dann nach 24 Std und weiter täglich.

Gruppe II b. Der Versuch begann mit der gleichzeitigen Applikation von Streptolysin O und ATP in den angeführten Dosen.

In Abständen von 3 Tagen wurde dann 2mal das Typhusgift appliziert, bei der 4. Verabreichung wurde 3 Ratten Streptolysin O und 3 das Typhusendotoxin gegeben und zuletzt bekamen alle Tiere Streptolysin O.

Versuchsergebnisse

Gruppe I. Abb. 1 zeigt, wieviel Signale die einzelnen Tiere zur festen Ausarbeitung der einzelnen bedingten Reflexe brauchten. Im allgemeinen kann man sagen, daß gewöhnlich die Tiere, welche zur Ausarbeitung des ersten positiven Reflexes eine große Anzahl von *Verbindungen* brauchen, relativ leichter die *Differenziationshemmung* bilden und umgekehrt.

Die Veränderungen, welche durch die Applikation der Toxine verursacht wurden, sind aus Tab. 1 zu ersehen. Nach der ersten Verabreichung des Giftes kam es bei allen Tieren im Verlaufe von 30 min zu

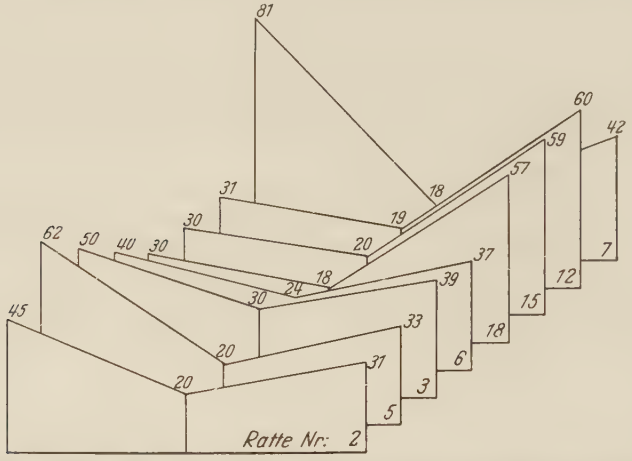
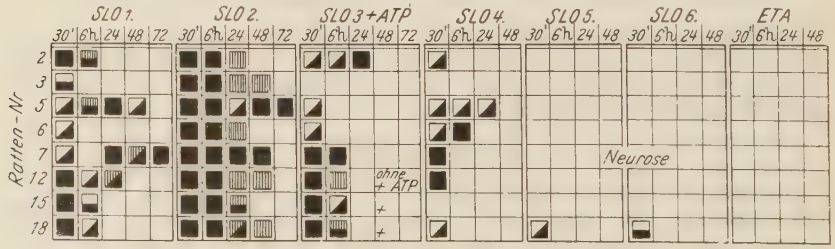


Abb. 1. Graphische Darstellung der Verbindungszahl, welche zu der Ausbildung der einzelnen Tiere notwendig war. Links: Zahl der notwendigen Glockensignale. Mitte: Zahl der notwendigen Lichtsignale. Rechts: Zahl der notwendigen Summersignale. Rechts unten: die Nummern der einzelnen Ratten

einer Hemmung eines Teiles oder aller positiven bedingten Reflexe. Nach 6 Std dauerten bei 5 von 8 Tieren die Veränderungen noch an und bei 2 Ratten kam es außer Hemmungserscheinungen der positiven Reflexe

Tabelle 1 (Gruppe I). *Übersicht der bedingten Reflexe nach den einzelnen Applikationen von Streptolysin O.*

SLO Streptolysin O, die Nummer bedeutet, zum wievielten Male das Gift gegeben wurde. ■ 65—100% der positiven bedingten Reflexe vollkommen gehemmt. ▬ 30—65% der positiven bedingten Reflexe gehemmt. ◪ 10—30% der positiven bedingten Reflexe gehemmt. ▩ Positive Reflexe meistens gehemmt. ▥ Differenziationsenthemmung. ▩ Ein Teil der positiven Reflexe gehemmt, Enthemmung der Differenziation. + ohne ATP.



noch zu einer Differenziationsenthemmung. Nach 72 Std waren alle Tiere bis auf die Ratte Nr. 7 normal. Die zweite Applikation von Streptolysin O nach 3 Wochen verursachte bei allen Tieren eine fast vollkommene

Hemmung der positiven bedingten Reflexe nicht nur nach 30 min, sondern auch noch nach 6 Std. Es kam nach 24 Std zu einer fast allgemeinen Enthemmung der Differentiation. Die dritte Injektion von Streptolysin O wurde bei allen Tieren bis auf 3 mit ATP kombiniert. Bei 7 Tieren kam es zu Veränderungen, welche jedoch weniger intensiv als bei der ersten Giftverabreichung waren. Nach der 4. Applikation reagierten nur 6 Tiere; der Verlauf der Sitzungen bei 2 Tieren war ganz normal. Nach der 5. Applikation kam es bei der Ratte Nr. 7 zu neurotischen Erscheinungen, so daß das Tier ausgeschaltet werden mußte. 6 Tiere reagierten nicht mehr

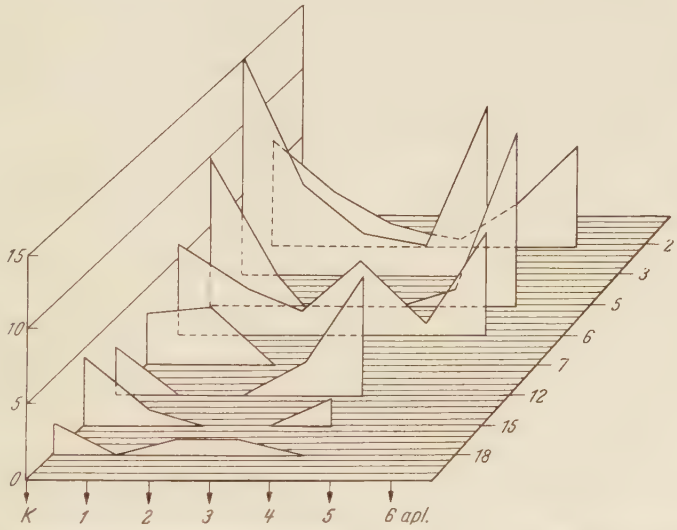


Abb. 2. Intersignalreaktionen nach Verabreichungen von SLO. Auf der vertikalen Achse—Zahl der Intersignalreaktionen. *K*-Werte vor der Streptolysinbehandlung. 1, 2. 3, 4, 5, 6 Werte nach der 1.—6. Applikation von Streptolysin. Rechts die Nummern der Tiere

auf Streptolysin O, ebenso das nächste Mal; bei einem Tier waren 30 min nach der Applikation leichte Veränderungen vorhanden. Nachdem als letzte Injektion das Typhustoxin injiziert wurde, blieben alle Ratten, trotz relativ hoher Dosis ohne Störungen der höheren Nerventätigkeit.

Das Verhalten der Tiere, die Freßlust, Beweglichkeit usw. war bis auf die Ratte Nr. 7, nachdem bei ihr die Neurose auftrat, vollkommen normal.

Bei allen Tieren verminderten sich die Intersignalreaktionen nach den Applikationen des Giftes bedeutend und kehrten allmählich zurück, nachdem Streptolysin O keine Veränderungen der bedingten Reflexe mehr verursachte (Abb. 2).

Gruppe IIA. Die Resultate sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Grundsätzlich kam es zu denselben Veränderungen wie in der Gruppe I. Das Streptolysin O, welches wir in dieser Versuchsserie gebrauchten, war

bedeutend weniger giftig als in den oben beschriebenen Versuchen, so daß die Veränderungen der bedingten Reflexe nicht so intensiv waren. —

Tabelle 2 (Gruppe IIa). Die oberste Zeile gibt die einzelnen Applikationen an. *SLO* Streptolysin O. *ETA* Endotoxin S. typhi abd. 2 Std und 24 Std. — 2 und 24 Std nach der Applikation des Giftes. Die Bedeutung der Quadrate siehe die vorige Tabelle. Teilweise Schraffur — Enthemmung der Differenziation. *N* normale Reaktionen d. i. normales Stereotyp

Ratten-Nr.	1. SLO 1. 2h	1. SLO 1. 24h	2. SLO 2. 2h	2. SLO 2. 24h	3. SLO 3. 2h	3. SLO 3. 24h	4. ETA 1. 2h	4. ETA 1. 24h	5. ETA 2. 2h	5. ETA 2. 24h
21	■	◒	▥	N	N	N	◒ unruhig	N	N	N
1	verlängerte Latenzzeit, keine Inter-Signalreak.	N	N	N	N	N	◒	N	N	N
3	verlängerte Latenzzeit	N	◒	◒	N	N	N	N		
5	◪	N	◪	■	N	N	N	N		
6	◒	◒	verlängerte Intervalle	N	N	N	N	N		
7	◪	N	N	N	N	N	◒	N	N	N

Schon nach der 3. Applikation von Streptolysin O kam es zu keinen Veränderungen der bedingten Reflexe mehr. Typhustoxin verursachte, zum

Tabelle 3 (Gruppe IIb). Dieselben Abkürzungen wie in der vorigen Tabelle. *ATP* Applikation von Natriumsalz der Adenosintriphosphorsäure 1 mg/kg intravenös (Schwanzvene)

Ratten-Nr.	1. SLO+ATP 2h	1. SLO+ATP 24h	2. ETA 1. 2h	2. ETA 1. 24h	3. ETA 2. 2h	3. ETA 2. 24h	4. ETA 3. 2h	4. ETA 3. 24h	5. SLO 2h	5. SLO 24h
22	◒	N	■	verlängerte Intervalle u. Latenzzeit	▥	N	verlängerte Latenzzeit	N	N	N
8	◒	N	◒	N	Intersignal-reaktionen vermehrt 3x	N	N	N	N	N
9	◪	◒	◪	N	N	N	↓SLO	N		
23	◒	N	Intersignal-reaktionen vermehrt 3x	N	N	N	↓SLO	N		
27	◒	N	■	N	N	N	↓SLO	N		
28	◒	N	■	N	verlängerte Latenzzeit	N	N	N	N	N

ersten Male angewendet, bei drei Tieren noch eine leichte Reaktion. Das nächste Mal war es ohne Wirkung.

Gruppe II B. In dieser Gruppe wurde zum ersten Male ATP mit Streptolysin O kombiniert. Bei allen Tieren sehen wir teilweise Hemmungsphänomene. Zum 2., 3. und 4. Mal wurde Endotoxin der S. typhi abdominalis gegeben, schon nach der 2. Verabreichung waren 3 von 6 Tieren normal und diese blieben auch nach Streptolysinapplikation normal, ebenso wie jene, bei welchen das ganze Bild um eine Typhustoxinverabreichung verschoben war (Tab. 3).

Diskussion

Zum Unterschied von Chozak u. Goršeleva, welche bei Ratten nach einmaliger Applikation von Diphtherie- und Staphylokokkentoxin schwere Veränderungen im Allgemeinverhalten der Tiere und Monate andauernde Veränderungen der bedingten Reflexe verzeichneten, gaben wir so kleine Dosen des Giftes, daß keine Intoxikationserscheinungen vorkamen. Dennoch kam es bei der ersten Applikation von Streptolysin O zu Veränderungen der bedingten Reflexe, die als Hemmungsphänomene bezeichnet werden können.

Ähnliche Resultate sah Šterc[21, 22] mit kleinen Dosen des Endotoxins der S. typhi abdominalis. Es überrascht nicht, daß nach wiederholter Verabreichung von Streptolysin O das Gift seine Wirkung auf die höhere Nerventätigkeit verliert. Diese Resultate können mit der Immunisierung des Organismus gegen Streptolysin O in Verbindung gebracht werden. Sehr interessant ist, daß die Veränderungen der Reaktivität auf Streptolysin O in 2 Phasen verlaufen, besonders, wenn zwischen der ersten und zweiten Applikation des Giftes eine Zeitspanne liegt, welche dem optimalen Intervall von 3 Wochen bei der Auslösung von anaphylaktischem Schock durch artfremdes Eiweiß entspricht.

Nach der zweiten Applikation kommt es zu einer ausgeprägten Verlängerung der Veränderungen der bedingten Reflexe. Bei der dritten und den weiteren Applikationen kommt es dann zu einer Adaptation. Die Versuche zeigen auch, daß die Wirkungen von Streptolysin O auf das zentrale Nervensystem nicht mit der hämolytischen Eigenschaft des Giftes, sondern mit der Toxicität zusammenhängen. Schon früher zeigte einer von uns, daß die Toxicität und die hämolytischen Eigenschaften von Streptolysin O unabhängige Größen sind. (Háva, Syrůček, Rašková 1955[11]).

Besonders interessant erscheint uns die Tatsache, daß die Adaptation des Nervensystems auf Streptolysin O nicht spezifisch ist, sondern daß Tiere, welche auf *Streptolysin O* nicht mehr mit Veränderungen der bedingten Reflexe reagieren, auch nach der Applikation von *Typhusendotoxin* keine Veränderungen aufweisen und umgekehrt, ob zwar alle Tiere auf dieses Gift reagieren, wenn es vor dem Stadium der vollen Adaptation gegeben wird. An einer anderen Gruppe von Ratten mit ausgearbeiteten

bedingten Reflexen zeigte Šterc[21], daß die Tiere bei der ersten Begegnung mit Typhustoxin ausgeprägte Hemmungsveränderungen aufweisen.

Aus der Literatur wissen wir, daß Endotoxine verschiedenen Ursprungs eine Reihe ähnlicher pharmakologischer Eigenschaften besitzen (Übersicht aus letzter Zeit siehe Thomas 1954[22] und van Heyningen 1955[12]). Es handelt sich hauptsächlich um schwere vasomotorische Veränderungen (Delaunay, Boquet[7], Kroneberg u. Pötsch[14] u. a.), Temperaturveränderungen, Leukocytenveränderungen, hämorrhagische Nekrosen in wachsenden Tumoren und etliche biochemische Veränderungen im Organismus (Bennet[3, 4], Beeson[1, 2], Gratia u. Linz u. a.[10]).

Eine Reihe von Autoren zeigte, daß nach wiederholter Verabreichung *eines* Endotoxins Tiere auch nach der Verabreichung *anderer* Endotoxine keine Veränderungen der Temperatur, Leukocytenzahl usw. aufweisen (Beeson, Good u. Thomas[8]).

Diese nichtspezifische Resistenz wurde bisher nur für Endotoxine beschrieben. In seiner im Jahre 1955 vorgetragenen und publizierten Zusammenfassung ist van Heyningen der Ansicht, daß sich Endotoxine und Exotoxine pharmakologisch prinzipiell verschieden verhalten, denn die Exotoxine verhalten sich zum Unterschied von Endotoxinen spezifisch und haben ein viel typischeres und differenziertes pharmakologisches Bild im Organismus. In eigenen Versuchen haben wir uns überzeugt, daß z. B. die Wirkung von Streptolysin O auf das Säugetierherz spezifisch ist, während Endotoxine das Herz nicht angreifen (Vaněček u. Rašková 1955[23]); wir sehen jedoch, daß in einer Reihe von Eigenschaften bakterieller Toxine es nicht möglich ist, Exotoxine von Endotoxinen respektiv Pseudotoxinen (van Heyningen) abzusondern. Dies zeigen die in dieser Arbeit angeführten Resultate ebenso überzeugend, wie es die Resultate unserer Versuche über die Wirkung bakterieller Toxine auf das Nerven-Muskelpräparat der Katze und des Kaninchens bestätigen. Einer von uns zeigte vor einigen Jahren, daß die lokale Applikation des Shigella shigae Neurotoxin (Rašková u. Mitarb. 1952[17, 18]) auf den N. ischiadicus von Kaninchen und Katzen Veränderungen der tetanischen Kontraktionen verursacht, wie sie seinerzeit Wvedenskij[26] nach der Applikation von Chloroform und anderen Giften sah. Nach wiederholter Applikation des Giftes wurde der Nerv toxinresistent. Bei der so veränderten Reaktivität gelang es auch mit Phenol nicht, die üblichen Veränderungen hervorzurufen. In unserer weiteren Mitteilung zeigen wir, daß es auch mit Streptolysin O möglich ist, die Vorgänge der sogenannten Parabiose Wvedenskijs zu erzielen und daß die wiederholte Applikation des Giftes die Tiere nicht nur gegen das angewandte Gift, sondern auch gegen den Shigella shigae Neurotoxin resistent macht, ebenso wie gegen Phenol.

In unserer vorgehenden Arbeit zeigten wir, daß Streptolysin O die Chemoreceptoren im Organismus beeinflußt und zwar in verschiedener Weise, je nach Reaktivität des Organismus, ob es schon mit dem Gifte in Berührung kam. In dieser Mitteilung zeigt es sich, daß schon kleine Dosen des Streptolysin O, eines typischen Exofermentes, welches von Streptokokken produziert wird und dessen Giftigkeit niedriger ist als die des Typhusendotoxin, auch den Verlauf bedingter Reflexe ändern. Arbeiten von Penner u. Klein[16], Kroneberg u. Mitarb.[14, 15] und in letzter Zeit Bridgewater, Morgan, Bowson u. Payiling Wright[5] betonen direkte Wirkungen der Dysenterietoxine auf das Nervensystem. In unseren Arbeiten vor einigen Jahren zeigten wir auch die Wirkung des Shigella shigae Toxin auf verschiedene Teile des Reflexbogens. Unsere weiteren Befunde zeigen uns jedoch, daß die funktionellen Veränderungen, welche die Dysentericotoxine in der Nerventätigkeit verursachen, nicht nur an sie gebunden sind und daß Veränderungen nicht nur mit verhältnismäßig giftigen Substanzen wie dem Typhusgift, sondern auch mit weniger giftigen Substanzen wie Streptolysin O zustande kommen. Die erworbene

Resistenz gegen *ein* Gift bedeutet eine erhöhte Resistenz auch gegen *andere* Toxine, welche durchaus nicht mit der Gruppierung in Endo- oder Exotoxine abgegrenzt sind.

Es scheint uns, daß die Angreifbarkeit des Nervensystems durch bakterielle Toxine und die breite Möglichkeiten erworbener Resistenz Fragen aufwerfen, die für die Pathogenese und unspezifische Therapie von Erkrankungen, bei welchen Toxine mitwirken, eine wichtige Rolle spielen können.

Zusammenfassung

1. Bei 20 Ratten wurde ein Stereotyp von bedingten Futterreflexen ausgearbeitet.

2. Dosen von Streptolysin O und Typhustoxin, welche das Verhalten der Tiere noch nicht verändern, verursachen schon teilweise oder komplette Hemmung der positiven bedingten Reflexe.

3. Nach wiederholter Applikation eines Giftes werden die Tiere gegen das Toxin resistent und reagieren nicht mehr mit Veränderungen der bedingten Reflexe.

4. Tiere, die nicht mehr auf Streptolysin O reagieren, sind auch für Typhustoxin unempfindlich und umgekehrt.

Wir danken Frau Olga Fialová für technische Hilfe.

Literatur

[1] Beeson, P. B.: J. of Exper. Med. **86**, 29 (1947). — [2] Beeson, P. B.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **64**, 146 (1947). — [3] Bennet, I. L. jr.: J. of Exper. Med. **88**, 267 (1948). — [4] Bennet, I. L., and P. B. Beeson: Medicine (Baltimore) **29**, 365 (1950). — [5] Bridgewater, F. A. J., R. S. Morgan, K. E. K. Rowson, G. Payling, Wright, G.: Brit. J. Exper. Path. **36**, 447 (1955). [6] Chozak, L. E.: Ž. vyššej. Nerv. **2**, 233 (1952). — [7] Delaunay, J.: J. de Physiol. **40**, 89 (1948). — [8] Good, R. A., and L. Thomas: zit. nach Thomas, L.: Ann. Rev. Phys. **16**, 467 (1954). — [9] Gorševeleva, L. S., L. E. Chozak: Ž. vyššej. Nerv. **2**, 411 (1952). — [10] Gratia, A., et R. Linz: C. r. Soc. biol. (Paris) **108**, 427 (1931). — [11] Háva, M., L. Syrůček u. H. Rašková: Fol. haemat. (Lpz.) 1955, im Druck. — [12] Heyningen, W. E. van: Schweiz. Z. Allg. Path. **18**, 1018 (1955). — [13] Kotljarevskij, L. I.: Ž. vyššej. Nerv. **1**, 753 (1951). — [14] Kroneberg, G., u. E. Pötsch: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 213 (1952). — [15] Kroneberg, G., u. W. Sandritter: Z. exper. Med. **120**, 329 (1953). — [16] Penner, A., and S. H. Klein: J. of Exper. Med. **96**, 59 (1952). — [17] Rašková, H., K. Raška, V. Matějovská u. B. Rybová: Čas. lék. českých **91**, 612 (1952); **91**, 1348 (1952). — [18] Rašková, H., K. Raška, V. Matějovská u. B. Rybová: Československá hygiena, epidemiologie, mikrobiologie (HEM) **2**, 44 (1953). — [19] Rašková, H., K. Raška, V. Matějovská, u. B. Rybová: HEM **4**, 450 (1955). [20] Šterc, J.: Physiologia bohemslovenica **3**, 419 (1954). [21] Šterc, J.: Časopis lék. českých (tschechisch) **94**, 201 (1955). — [22] Thomas, L.: Ann. Rev. Phys. **16**, 467 (1954). — [23] Vaněček, J., u. H. Rašková: Konferenz der kinderärztlichen Fakultät Prag. November 1955. [24] Vaněček, J., u. H. Rašková: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 1 (1956). — [25] Wvedenskij, N. E.: Erregung, Hemmung und Narkose Pflügers Arch. **82**, 134 (1900).

Dozent Dr. Helena Rašková, Prag II. (ČSR.), Albertov 4, Pharmakol. Katheder d. kinderärztl. Fakultät d. Karlsuniversität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 16—25 (1956)

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Freiburg i. Brsg. (Direktor: Prof. Dr. H. J. Sarre) und dem pharmakologischen Laboratorium der Firma Gödecke & Co, Chemische Fabrik AG. (Leiter: Dozent Dr. A. Enders)

Silberelimination im Organismus bei experimenteller Argyrie

Von

A. Enders und A. Moench

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. März 1956)

Umfassende Darstellungen über experimentelle Argyrie haben W. Heubner in der Monographie im Handbuch der experimentellen Pharmakologie 1934 und W. R. Hill u. D. M. Pillbury in ihrem Werk „Pharmacology of Silver" gegeben. In unserem Rahmen interessierten besonders die Versuche von Huet und Dechant. Huet fütterte 4 Ratten mit Brotkrumen, die er mit Zucker und Silbernitrat bestreut hatte. Wieviel Silbernitrat unter diesen Umständen von den Ratten aufgenommen wurde, konnte Huet nur schätzen. Nach 4-, 6-, 12- und 14monatiger Fütterung sah Huet in den Leberschnitten schwärzliche Verzweigungen um jeden Acinus, in den Nieren waren die Glomerula schiefrig gefärbt, die Papillen wiesen eine Schwarzstreifung auf, ebenso die absteigenden Äste der Henleschen Schleifen. Wurde von Huet somit tatsächlich eine Argyrie erzeugt, so ist es doch angesichts der geringen Tierzahl nicht möglich, eine Beziehung zwischen der verfütterten Silberdosis und dem Ausmaß der aufgetretenen Veränderungen zu erkennen. Dechant fütterte 4 Hunde 3, 7 Wochen und 9 Jahre lang mit Kollargol. Das 9 Jahre lang täglich mit 0,1 g gefütterte Tier zeigte in der Niere Silberniederschläge auch in den Glomerula. Diese fehlten bei den kürzere Zeit behandelten Tieren. Ein Hund, der 2 Monate nach der 7 Wochen dauernden Verfütterung getötet wurde, zeigte in den Nieren keine positiven Befunde. Auch Heubner ist der Ansicht, daß diese Befunde trotz der geringen Anzahl der verwendeten Tiere darauf hindeuten, daß das abgelagerte Silber in den Organen wieder verschwinden kann.

Nach unserer Ansicht ist gegen die Ergebnisse von Dechant, selbst wenn man von der geringen Tierzahl absieht, noch ein weiterer Einwand möglich: Die Argyrieveränderungen nach Silberverfütterung sind nur in beschränktem Maß Dosen und Zeit adäquat. Daher ist bei einem negativen Befund nach einer dreimonatigen silberfreien Periode die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß die Niere während der Verfütterungsperiode überhaupt von vornherein kein Silber eingelagert hat. Ähnliche Einwände könnte man auch gegenüber den anderen von Heubner ausführlich zitierten Arbeiten erheben. Wir stellten uns daher zur Aufgabe, diesen Befunden mit einer verbesserten Methodik nachzugehen.

Methodik

Als Versuchstiere verwendeten wir Albinoratten, die im Alter von 4 Wochen bei einem Gewicht von etwa 50 g in Versuch genommen wurden. Die Tiere wurden einzeln in Drahtkäfigen bei einer Raumtemperatur von 23° C gehalten. Die verwendeten Silbersalzlösungen, Argentum nitricum und Diacetyltannin-Silbereiweiß (Targesin-Gödecke), wurden in wäßrigen Lösungen, homogen mit dem Futterbrei vermischt, verabreicht. Dieser hatte konstante Zusammensetzung und bestand aus Haferflocken, Trockenmilch, Lebertran und McCollum-Salz (näheres bei Enders). Die Ratten erhielten davon pro Tag 15 g, d. h. eine qualitativ vollwertige, aber kalorisch unzureichende Kost. Sie bekamen eine begrenzte Nahrungsmenge, damit bei dieser Art leichter Unterernährung der mit Silbersalzlösung versetzte Futterbrei innerhalb einer 24stündigen Fütterungsperiode vollständig aufgenommen wurde. (Näheres über die Art und Berechtigung dieses Vorgehens bei chronischen Vergiftungen siehe bei Enders.) Bei vergleichenden Versuchen mit Argentum nitricum und Diacetyltannin-Silbereiweiß wurden stets zehnmal so starke Lösungen von Diacetyltannin-Silbereiweiß wie von Argentum nitricum verwendet, da Diacetyltannin-Silbereiweiß 6% und Argentum nitricum 60% Silber enthält.

Die Nephrektomien und partiellen Hepatektomien wurden in leichter Äthernarkose ohne besondere Sterilitätsmaßnahmen durchgeführt. Leberparenchymblutungen wurden, wenn nötig, durch Aufstäuben von Thrombin (Thrombo-Tuffon) gestillt. Nach der Beendigung der Operation wurde in die Bauchhöhle und auf die Wunde Marfanil-Prontalbin-Puder aufgestäubt. Am Tage der Operation und an dem der Operation folgenden Tage erhielt jedes Tier 30000 Einheiten Penicillin oder 2 mg Achromycin. Bei Verwendung des Achromycin schienen sekundäre Eiterungen usw. noch seltener als bei Verwendung von Penicillin aufzutreten.

Zur histologischen Methodik sei folgendes bemerkt: Alle Organe wurden in 10%igem neutralem Formalin fixiert. Bei den Gefrierschnitten diente Hämatoxylin-Sudan zum Nachweis lipoidartiger Substanzen. Bei den Paraffinschnitten wurde Kernechtrot zum Nachweis der Versilberung benutzt, außerdem Hämatoxylin-Eosin und Trichrom nach Goldner verwendet.

Zu den Mikroaufnahmen wurde ein Forschungsmikroskop Zeiß, W-Stativ, Kleinbildaufsatz benutzt. Zur besseren Darstellung des Zellzustandes wurden die Aufnahmen von Hämatoxylin-Eosin-Schnitten angefertigt. Histologisch untersucht wurden Duodenum, Leber und Niere. Wir wählten das Duodenum als Ort der ersten Resorption, die beiden anderen Organe, weil sie allgemein bei Schwermetallintoxikationen den größten Metallgehalt zeigen sollen und weil sie als Ausscheidungsorgane für Schwermetalle gelten.

Bei der Silberablagerung in diesen Organen unterschieden wir grundsätzlich:

1. Die Speicherung von Silbergranula im Reticulo-Endothelialen System (Kupfersche Sternzellen, Fibrocyten, Histiocyten) sowie in den Parenchymzellen (Leberepithelien, Tubulusepithelien der Niere).

2. Die Imprägnierung der Basalmembranen (Gefäßintima, Nierentubuli, Darm).

Nur der unter 2 genannte Befund wurde von uns als echte Argyrose, d. h. Ansammlung von Schwefelsilber in fibrösen und elastischen Fasern und Membranen gewertet.

In unseren argyrotischen Nieren fand sich nur eine zum Teil allerdings sehr ausgeprägte Versilberung der intertubulären Basalmembranen und zwar vorwiegend der proximalen Konvolute. Dagegen waren die Glomerula frei von Silberniederschlägen. Neuerdings konnte zwar auch Olcott ähnlich wie Huet und Dechant mit bedeutend größeren Dosen und über einen längeren Zeitraum eine eindeutige Versilberung der Glomerula erzielen — neben der Versilberung der

Tubulusmembranen. Unter Berücksichtigung auch seiner übrigen Befunde stellt dieses nur einen graduellen Unterschied zu unseren Ergebnissen dar. Eine derartig weitgehende Versilberung auch der Glomerula schien uns für unsere Fragestellung der grundsätzlichen Rückbildungsfähigkeit einer einmal aufgetretenen Argyrose nicht erforderlich.

Ergebnisse

Das allgemeine Befinden der mit Silber behandelten Tiere unterschied sich in nichts von dem der Kontrolltiere. Der Gewichtszuwachs war, entsprechend der Unterernährung, gering, entsprach aber der Entwicklung der silberfrei ernährten Ratten. Auch die Tiere, die partiell hepatektomiert und einseitig nephrektomiert waren, zeigten in den der Operation folgenden Monaten, mit wenigen Ausnahmen, keine krankhaften Störungen; nur einige Ratten wurden wegen Abscedierung usw. ausgeschieden.

In Vorversuchen untersuchten wir, ob für unsere Fragestellung Argentum nitricum und Diacetyltannin-Silbereiweiß in gleicher Weise geeignet wären. Dabei fanden wir, daß bei Verwendung größerer Dosen, nämlich von 1 g Diacetyltannin-Silbereiweiß oder 100 mg/kg/Tag Silbernitrat nach mehrmonatiger Fütterung die mit Argentum nitricum behandelten Tiere degenerative Nierenschädigungen zeigten, die nach Diacetyltannin-Silbereiweiß fehlten. Nähere Einzelheiten sind aus der Abb. 1 a und 1 b zu ersehen. In diesem Zusammenhang interessiert die Angabe von Knack, der bei einer schweren Argyrose eine Albuminurie gefunden hat.

Um die Ursache der Nierenschädigungen zu klären, erhielten Ratten Nitratsalzlösungen, bei denen die Kationen statt aus Silber aus Natrium, Kalium und Calciumionen in physiologischer Relation bestanden, die Anionen wie beim Argentum nitricum aus Nitrationen. Auch hier traten dieselben Nierenschäden auf. Wir verwendeten daher in den weiteren Versuchen nur Diacetyltannin-Silbereiweiß-Lösungen. Dabei mußten wir zuerst die Dosen und Zeiten feststellen, nach denen mit größtmöglicher Sicherheit eine Argyrie auftrat. Diese Vorversuche und ihre Ergebnisse sind in der folgenden Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Tierzahl	Verfütterungszeit Tage	Silberdosis pro kg und Tag mg	Histologischer Befund		
			Duodenum	Leber	Niere
6	180	0,24	+	+	(+)
6	14	1,5	(+)	∅	∅
6	42	1,5	+	(+)	?
6	84	1,5	+/++	+	(+)
6	84	6,0	++	++	++
4	84	15,0	++++	++++	+++

Erklärung: ? fragliche Imprägnierung; (+) ganz schwache Imprägnierung; + deutliche Imprägnierung; ++ stärkere, mehr herdförmige Imprägnierung; +++ diffuse Imprägnierung; +++ ausgeprägte diffuse tiefschwarze Imprägnierung des Gefäßbindegewebes, RES gefüllt mit Ag-Granula; ∅ negativ; — nicht untersucht.

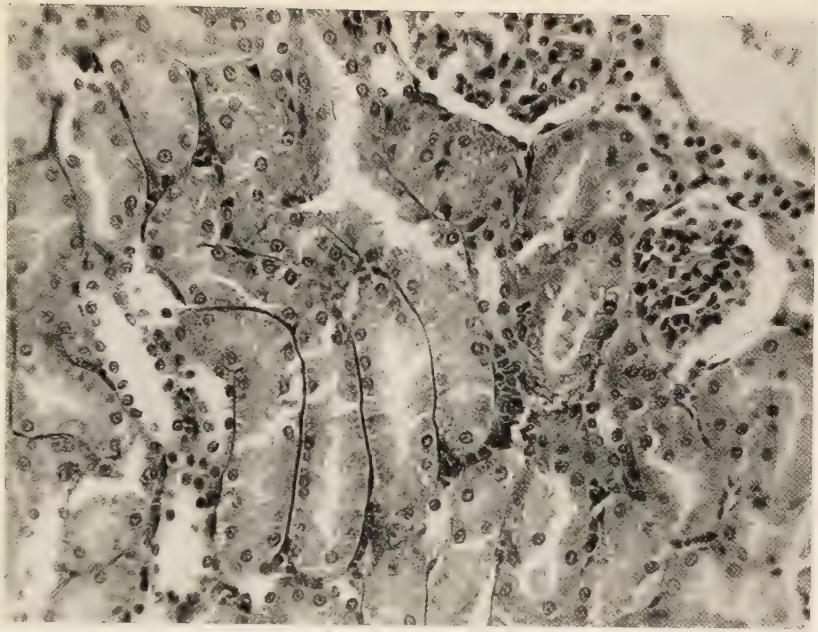


Abb. 1a

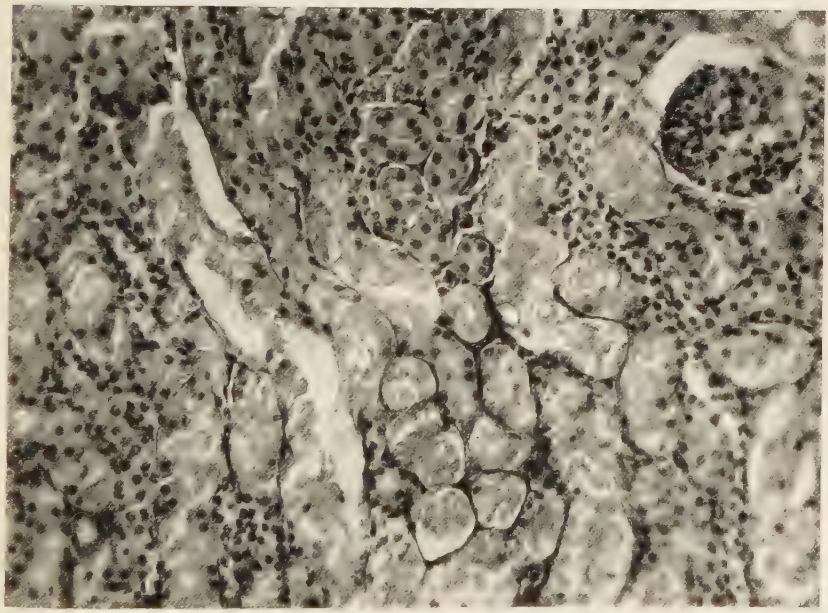


Abb. 1b

Abb. 1a. Niere nach dreimonatiger Fütterung von 1 g/kg/Tag Diacetyltannin-Silbereiweiß. Trotz starker Versilberung ist das Nierenparenchym weitgehend intakt. Abb. 1b. Niere nach dreimonatiger Verfütterung von 100 mg/kg/Tag Argentum nitricum. Es zeigen sich schwere degenerative Tubulusveränderungen bis zum Untergang der Tubulusepithelien und interstitielle Bindegewebsvermehrung. Vergrößerung a) etwa 600×, b) etwa 400×. Beide Dosen entsprechen 60 mg Silber/kg/Tag

Abb. 2a

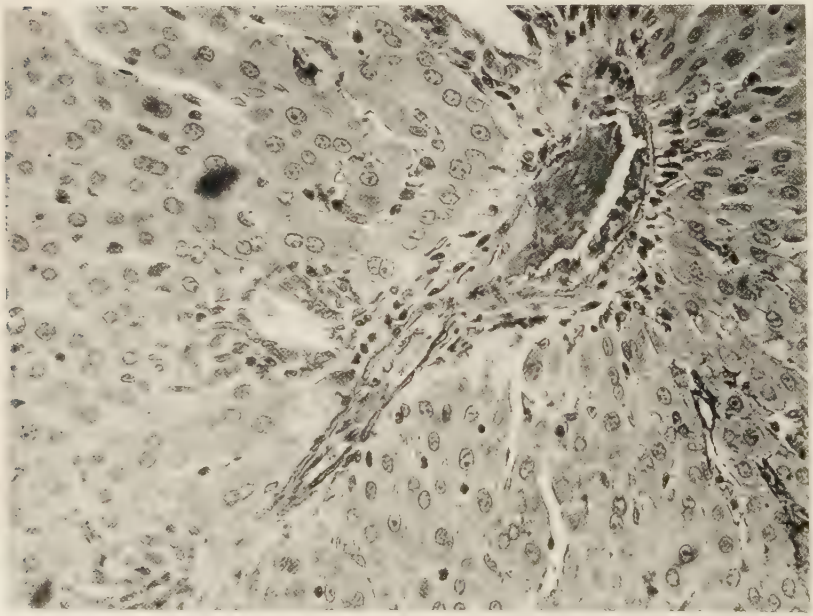


Abb. 2b

Abb. 2a. Leber, unmittelbar nach dreimonatiger Verfütterung von 6 mg/kg/Tag Silber. Man erkennt deutlich die Silberimprägnierung der Gefäßmembranen im Bereich der periportalen Felder. Auch die KUPFERschen Sternzellen zeigen eine feine Speicherung von Silbergranula. Abb. 2b. Schnitt aus der Leber des gleichen Tieres nach dreimonatiger anschließender silberfreier Ernährung. Völliger Rückgang der Silberimprägnierung der Gefäßmembranen, nur noch geringe Speicherung von Silbergranula in den Sternzellen (vgl. hierzu Abb. 5). Vergrößerung a) etwa 600×, b) etwa 400×. Siehe Tab. 2. Tier Nr. 215

Aus Tab. 1 geht hervor, daß eine gewisse, wenn auch nicht absolute Abhängigkeit der Silberniederschläge von der Größe der verfütterten Dosis und der Zeit der Verfütterung besteht. Allerdings zeigt die erste Zeile der Tab. 1, daß die langdauernde Verfütterung kleiner Mengen

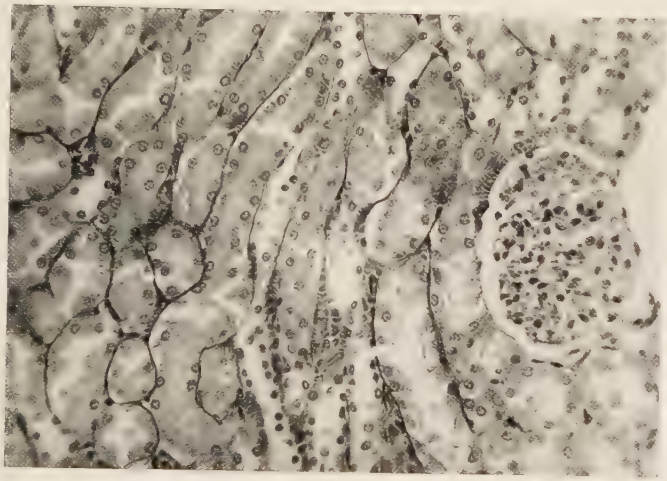


Abb. 3a

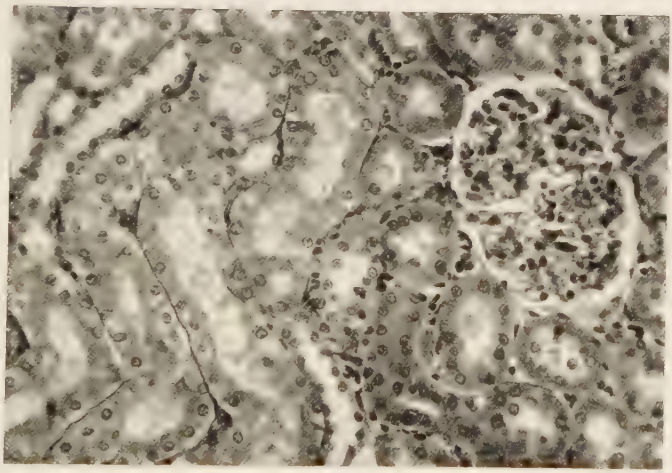


Abb. 3b

Abb. 3a. Niere, unmittelbar nach dreimonatiger Verfütterung von 6 mg/kg/Tag Silber. Man erkennt deutlich, daß die Glomerula wie ausgespart erscheinen, die tubulären Basalmembranen weitgehend mit Silber imprägniert sind. Die tubulären Epithelien sind völlig intakt. Bei einem Vergleich mit Abb. 1a erkennt man, daß trotz der wesentlich größeren Dosis die Imprägnation dort nicht im gleichen Verhältnis stärker ausgebildet ist. Abb. 3b. Nach anschließend dreimonatiger silberfreier Ernährung ist es innerhalb der kontralateralen Niere zu einer kompensatorischen Hypertrophie gekommen, völliger Rückgang der Silberimprägnierung. Beide Abbildungen etwa 600× vergrößert. Siehe Tab. 2, Tier Nr. 207

relativ stärkere Imprägnationen bewirkt als kürzere Applikation mehrfach stärkerer Dosen. Dies versteht sich von selbst, wenn man berücksichtigt, daß in der Zeiteinheit keine unbegrenzte Silbermenge aus dem Darm in den Körper aufgenommen werden kann. Aus der Tab. 1 folgt weiter, daß es Dosen und Verfütterungszeiten gibt (Zeile 2), die relativ groß sind und doch mit Sicherheit außer lokalen Niederschlägen im Dünndarm keine allgemeine Argyrie verursachen.

Der histologische Befund geht aus Abb. 1a, 2a, 3a und 4 hervor.

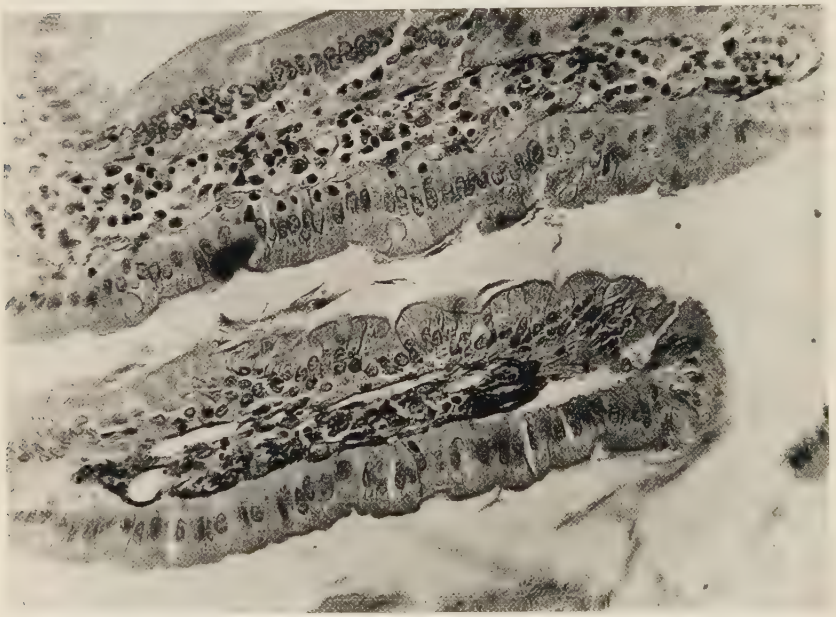


Abb. 4. Duodenum. Auch hier Versilberung vorwiegend der epithelialen Membran, und zwar ganz vorwiegend im Kuppengebiet der Zotten. In dem lockeren Bindegewebsstroma der Zotten zahlreiche mit Silber-Granula gespeicherte Fibrocyten und Hystiocyten. Zustand unmittelbar nach Abbruch der dreimonatigen Fütterung mit Silber (6 mg/kg/Tag). Vgl. Tab. 2, Duodenum. Vergrößerung etwa 400×

Auf Grund dieser Vorversuche wurde die Dosis von 6 mg/kg/Tag Silber 3 Monate lang verfüttert. Bei dieser Dosis war nach den bisherigen Ergebnissen zu erwarten, daß sowohl Duodenum als auch Leber und Niere Niederschläge zeigen würden. Um diese Erwartung aber zu sichern, wurden den Tieren nach dieser Verfütterungsperiode von Silber ein Stück Leber und die linke Niere excidiert und histologisch untersucht. Nach weiteren 3 oder 6 Monaten silberfreier Ernährung wurden die Tiere getötet und dann der histologische Befund bei jeder Ratte mit dem vor 3 Monaten oder 6 Monaten erhaltenen verglichen. Die Ergebnisse gehen aus der nachfolgenden Tab. 2 hervor.

Tabelle 2. *Änderung im Silbergehalt von Duodenum, Leber und Niere nach 3 oder 6 Monate langer silberfreier Ernährung nach vorausgegangener bioptisch gesicherter Argyrose*

Spalte A: Unmittelbar nach Abschluß der 3monatigen Fütterung mit Silber. Spalte B: Nach einem Intervall von 3 Monaten silberfreier Fütterung. Spalte C: Nach einem Intervall von 6 Monaten silberfreier Fütterung

Tier Nr.	Leber			Niere			Duodenum	
	A	B	C	A	B	C	B	C
201	++	(+)	—	(+)	∅	—	∅	—
202	+++	(+)	—	+	∅	—	∅	—
203	+++	∅	—	+	∅	—	∅	—
205	+/++	∅	—	(+)	∅	—	∅	—
206	+++	+	—	+	∅	—	∅	—
207	++/+++	(+)	—	+/++	∅	—		
212	+/— —				∅		∅	
213	+++	(+)	—	++	∅	—	∅	—
215	++++	(+)	—	+++	∅	—	∅	—
216	++	(+)	—	+	∅	—	∅	—
217	++++	—	∅	++	—	(+)	—	∅
218	+++/++++	—	∅	++	—	∅	—	∅
219	+++/++++	—	∅	++	—	∅	—	∅
221	++++	—	(+)	++/+++	—	∅	—	∅
223	+++/++++	—	(+)	++/+++	—	∅	—	(+)
224	++/+++	—	∅	++/+++	—	∅	—	∅
227	+/++	—	∅	(+)	—	∅	—	∅
229	++/+++	—	(+)	+	—	∅	—	∅
230	++++	—	∅	+(+)	—	∅	—	∅

Zeichenerklärung siehe Tab. 1. Leber von Nr. 215 siehe Abb. 2, Niere von Nr. 207 siehe Abb. 3.

Zu der Tab. 2 ist noch zu bemerken, daß der Silbergehalt des Duodenums im Gegensatz zur Leber und zur Niere nicht sofort nach der Verfütterungsperiode histologisch kontrolliert wurde. Da aber die zu dieser Zeit untersuchten Leber- und Nierenpräparate Silberniederschläge einwandfrei enthielten und in allen Vorversuchen das Duodenum auch bei geringeren Dosen noch vor Leber und Niere befallen war, ist mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß auch in diesem Fall das Duodenum zuerst Silber enthalten hatte und daß dieses nach 3 Monaten verschwunden war.

Mit Sicherheit konnte aber für die Leber und Niere nachgewiesen werden, daß bei dem größten Teil der untersuchten Organe die vorher

festgestellte Argyrose reduziert bzw. nach 3 Monaten oder 6 Monaten verschwunden war. Histologische Einzelheiten gehen aus den Abb. 2b 3b und 5 hervor.

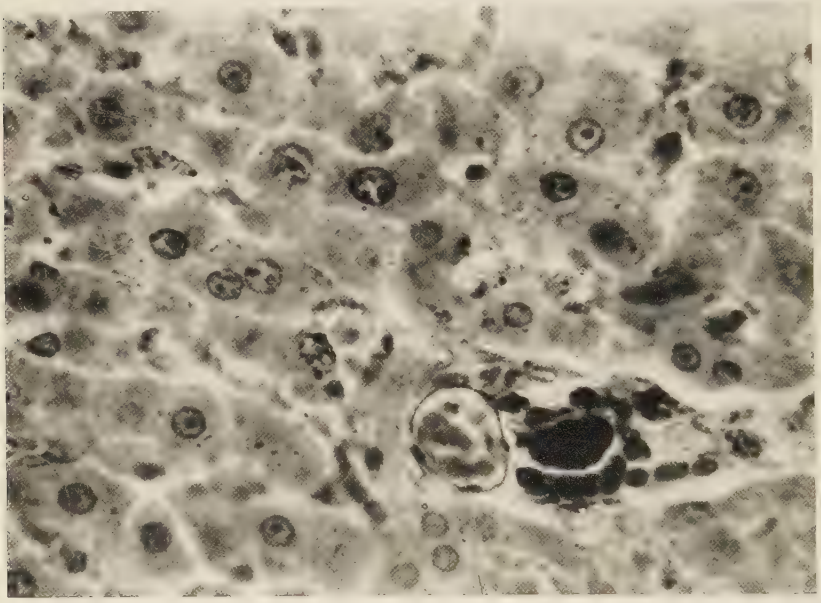


Abb. 5. Starke Vergrößerung aus einer Leber (Zentralvenenabschnitt) eines Tieres, welches unmittelbar nach dreimonatiger Silberfütterung (6 mg/kg/Tag) die stärkste Silberimprägnierung aufwies; hier drei Monate nach anschließend silberfreier Verfütterung. Die Intima der Zentralvene zeigt nur noch eine ganz schwache Imprägnierung, daneben Silbergranula in Sternzellen sowie Histiocyten. Auch in den Leberparenchymzellen feinste granuläre Silberablagerung, und zwar ganz vorwiegend im Bereich des den Gallecapillaren zugewandten Zellabschnittes. Vergrößerung etwa 800×

Diskussion

Die bisher bekannten Arbeiten über Argyrose (zit. bei Heubner, Hill u. Pillsbury; Huet, Dechant, Olcott) lassen keine sicheren Schlüsse über eine eventuelle Silberelimination nach eingetretener Argyrose zu. Unsere Versuche erlaubten eine Festlegung von Verfütterungszeiten und Silberdosen, die eine einwandfreie Argyrose, d. h. eine Silberimprägnation der Grundmembran von Leber und Nieren bewirkte. Dabei ergab sich als Nebenbefund, daß bei Verwendung großer Dosen durch Nitrat degenerative Nierenläsionen gesetzt werden.

Unterschwellige Dosen Silber rufen bei oraler Applikation Silberimprägnationen im Duodenum hervor, aber keine Argyrose in Leber und Niere.

Nach 3—6 Monaten silberfreier Ernährung zeigte sich eine Reduktion des Silbergehaltes in den von uns untersuchten Organen. Es steht also fest, daß niedergeschlagenes Silber in relativ geringen Zeiträumen wieder eliminiert werden kann.

Erwähnenswert ist noch, daß bei einer Verlängerung der Verfütterungszeit von 3 auf 6 Monate die verfütterte Menge Silber von 6 auf 0,24 mg, d. h. unverhältnismäßig stark verringert werden kann, ohne daß eine verminderte Silberimprägnation von Leber und Niere zu beobachten ist. Wir bringen dies mit der Tatsache in Zusammenhang, daß von den oral eingeführten Silbermengen nur ein sehr geringer Teil überhaupt resorbiert wird und daß die Resorptionsquote bei Steigerung der Dosis nicht adäquat erhöht werden kann.

Zusammenfassung

1. Die Verfütterung von Silber führt bei Ratten zu einer Argyrose von Duodenum, Leber und Niere. Das Ausmaß der Silberimprägnation in den Grundmembranen von Leber und Niere ist dabei der Dosis und der Zeit der Verfütterung von Silber annähernd proportional.

2. Die Verwendung von Argentum nitricum ruft im Gegensatz zu Diacetyltanninsilbereiweiß degenerative Nierenschäden hervor; sie werden durch das gleichzeitig eingebrachte Nitration verursacht.

3. Nach 3—6 Monaten silberfreier Ernährung im Anschluß an eine dreimonatige, zu einer sicheren Argyrose führenden Silberverfütterung, zeigt sich der Silbergehalt von Duodenum, Leber und Niere reduziert oder ist völlig geschwunden.

Literatur

Dechant, A.: Mh. prakt. Tierheilk. **22**, 1 (1911). – Enders, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 555—561 (1954). — Heubner, W.: Handbuch d. exper. Pharmakologie 3. Band, 3. Teil S. 2096—2104 (1934). – Hill, W. R., and D. M. Pillsbury: Argyria. The Pharmacology of Silver S. 4—18 passim, 44—57 passim. The Williams & Wilkins Company 1939 Baltimore. — Huet, M.: J. l'anat. et physiol. **9**, 408 (1873). Knack. — A. V.: Dtsch. med. Wschr. **43**, **1932**, 1672. — Olcott, Ch. T.: Amer. J. Path. **24**, 813—826 (1948).

Dozent Dr. A. Enders, Pharmakologisches Laboratorium d. Firma Gödecke & Co., Chemische Fabrik AG Memmingen/Allgäu
Dozent Dr. A. Moench, Mediz. Universitätspoliklinik Freiburg Br.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 26—33 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Über die Wirkung von Adenosin und Adenosinestern im Analgesietest an der Maus

Von
H. Giertz, H. Goebels und W. Rummel

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. März 1956)

Im Laufe von Untersuchungen über die Wirkung neuartiger Adenosinester, über die an anderer Stelle berichtet werden soll, war auch die Frage aufgetaucht, inwieweit den Adenosinkörpern auch zentrale Wirkungen zukämen. Dieses Problem wurde schon von Drury u. Szent-Györgyi diskutiert. Auch wir machten an Katzen nach Vergiftung mit sehr hohen Dosen Adenosin Beobachtungen, die in die gleiche Richtung zu deuten schienen. Es gelang uns jedoch nicht, durch Kombination mit Narkotica typische Adenosinwirkungen, nämlich die Wirkung auf den Kreislauf, die Körpertemperatur und das Blutbild, in einer Weise zu verändern, die einen zentralen Mechanismus vermuten ließe. Auch konnten wir keine eindeutige Beeinflussung der Narkose (Barbiturate) durch die Adenosinkörper erhalten. Dagegen wurden wir durch Gomahr, der an anderer Stelle kurz hierüber berichten wird, darauf aufmerksam gemacht, daß ein gewisser Synergismus zwischen Adenosin und Analgetica vom Typ des Pyramidon bestehe. Eine eingehendere Analyse dieses Phänomens erschien uns auch deshalb wichtig, weil gelegentlich über günstige Wirkungen von Adenosinkörpern bei rheumatischen Erkrankungen berichtet worden ist (Literatur siehe Herbrandt u. Jaeger).

Methodik

Als Versuchstiere dienten 15—25 g schwere Mäuse. Die analgetische Wirkung der untersuchten Substanzen wurde nach der Methode von Gross bestimmt. Die von uns verwandten Werte sind also Reaktionszeiten, als Reaktionszeit ist die Dauer vom Beginn der Bestrahlung des Mäuseschwanzes bis zum Wegziehen definiert. Reaktionszeiten vor der Injektion der untersuchten Substanzen wurden verglichen mit denen nach der subcutanen Injektion. Es wurde in einem Abstand von 15 min 2mal vor der Injektion und in gleichgroßen Abständen 4- bis 6mal nach der Injektion gemessen. Verglichen wurden die Werte 15 min vor und 15 min nach der Injektion, da die Wirkung aller untersuchten Substanzen durchweg 15 min nach der Injektion am deutlichsten war. Zum Vergleich wurden die erhaltenen Werte ins

Wahrscheinlichkeitsnetz nach Daeves u. Beckel eingetragen. Die Punkte im Wahrscheinlichkeitsnetz werden dadurch erhalten, daß die Gesamtheit der unter gleichen Bedingungen erhaltenen Werte der Größe nach geordnet und in beliebig große Gruppen unterteilt wird. Das arithmetische Mittel aus dem höchsten Wert einer Gruppe und dem niedrigsten Wert der folgenden Gruppe entspricht der Abszisse eines Kurvenpunktes. Da unsere Werte Reaktionszeiten sind, werden die Abszissenwerte in Sekunden angegeben. In der Ordinate steht jeweils der prozentuale Anteil, den alle Werte bis zu dem in der Abszisse angegebenen Wert an der Gesamtheit der Werte ausmachen (Summenhäufigkeitsprozent). Die Verbindung der so erhaltenen Punkte ergibt die Verteilungsgerade für unsere Werte. Das Ausmaß der Wirkungen einer Substanz geht aus der Verschiebung der Verteilungsgeraden nach der Injektion gegenüber der vor der Injektion erhaltenen Geraden hervor. Als Mittenwert C bezeichnen wir den Punkt unserer Verteilungsgeraden mit der Ordinate 50. Die Grenzwerte g_5 und g_{95}, zwischen denen 90% aller Werte liegen, sind die Punkte mit den Ordinaten 5 und 95. Der Streuungsfaktor g läßt sich nach folgender Gleichung berechnen:

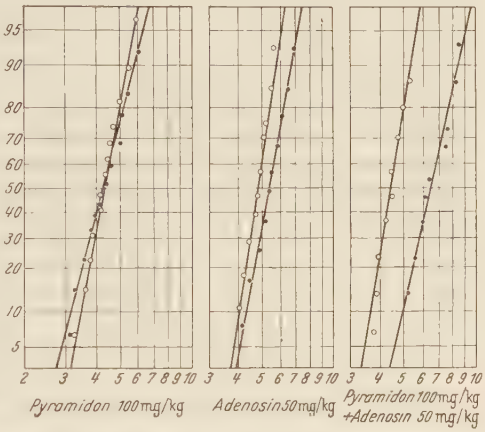


Abb. 1. Verteilungsgeraden (siehe Methodik) der Versuchsgruppen 9,3 und 11 aus Tab. 1. Ordinate: Summenhäufigkeitsprozent. Abszisse: Reaktionszeiten in Sekunden

$$g_s = \frac{g_{95}}{C} = \frac{C}{g_5}.$$

Zur Charakterisierung einer Verteilungsgeraden genügt der Kennwert: $C \cdot g_s^{\pm t}$, denn er stellt nach unserer obigen Gleichung nichts anderes als die Grenzwerte dar. In unseren Tabellen begnügen wir uns daher mit der Angabe der Kennwerte für jede Verteilungsgerade.

Tab. 1 zeigt die Ergebnisse aller Versuche, in denen Adenosin in Dosen von 10, 50, 100 und 300 mg/kg gegeben wurde. Die angegebenen Werte sind die im Analgesietest 15 min nach Injektion ermittelten Reaktionszeiten als Mittenwert im Wahrscheinlichkeitsnetz mit den Streufaktoren (= Kennwerte, siehe Methodik). Die Verlängerung der Reaktionszeiten durch die erfolgten Adenosingaben, d. h. also die Verschiebung der Mittenwerte, wird in Prozent vom Ausgangswert vor der Injektion angegeben.

Aus Tab. 1, Nr. 1—5, geht hervor, daß Adenosin in allen untersuchten Dosen einen analgetischen Effekt hat, während die Injektion von physiologischer Kochsalzlösung wirkungslos bleibt.

Im Gegensatz zum Adenosin blieb in unseren Versuchen Pyramidon wirkungslos (Tab. 1, Nr. 6 und 9). Die Dosis von 100 mg/kg änderte

lediglich den Streufaktor. Obwohl in unseren Versuchen Pyramidon selbst wirkungslos ist, kann es die analgetische Adenosinwirkung steigern. In einer Dosis von 100 mg/kg verstärkt es die Wirkung aller untersuchten

Tabelle 1

Nr.	Substanzen		n	Kennwerte (Mittenwerte × Streufaktor$^{\pm 1}$)		Verschiebung des Mittenwertes
	Adenosin mg/kg	Pyramidon mg/kg		15 min vor Injektion	15 min nach Injektion	in %
1*	0	0	50	$4{,}37 \cdot 1{,}47^{\pm 1}$	$4{,}37 \cdot 1{,}47^{\pm 1}$	0
2	10	0	30	$3{,}90 \cdot 1{,}23^{\pm 1}$	$4{,}10 \cdot 1{,}32^{\pm 1}$	5
3	50	0	39	$4{,}80 \cdot 1{,}27^{\pm 1}$	$5{,}40 \cdot 1{,}32^{\pm 1}$	12,5
4	100	0	40	$4{,}67 \cdot 1{,}20^{\pm 1}$	$5{,}80 \cdot 1{,}36^{\pm 1}$	24
5	300	0	30	$4{,}60 \cdot 1{,}39^{\pm 1}$	$5{,}90 \cdot 1{,}37^{\pm 1}$	28,5
6	0	50	29	$4{,}45 \cdot 1{,}21^{\pm 1}$	$4{,}45 \cdot 1{,}21^{\pm 1}$	0
7	50	50	30	$4{,}05 \cdot 1{,}28^{\pm 1}$	$4{,}60 \cdot 1{,}38^{\pm 1}$	13,5
8	100	50	30	$3{,}87 \cdot 1{,}27^{\pm 1}$	$5{,}30 \cdot 1{,}40^{\pm 1}$	37
9	0	100	49	$4{,}30 \cdot 1{,}33^{\pm 1}$	$4{,}30 \cdot 1{,}48^{\pm 1}$	0
10	10	100	29	$4{,}78 \cdot 1{,}24^{\pm 1}$	$5{,}33 \cdot 1{,}34^{\pm 1}$	11,5
11	50	100	30	$4{,}40 \cdot 1{,}28^{\pm 1}$	$6{,}50 \cdot 1{,}41^{\pm 1}$	46,5
12	100	100	30	$3{,}90 \cdot 1{,}48^{\pm 1}$	$6{,}00 \cdot 1{,}63^{\pm 1}$	54
13	300	100	27	$4{,}10 \cdot 1{,}34^{\pm 1}$	$6{,}17 \cdot 1{,}52^{\pm 1}$	50,5

* Die Versuchstiere erhielten physiologische Kochsalzlösung 10 ml/kg.

Adenosindosen erheblich (Tab. 1, Nr. 10—13). Die Dosis von 50 mg/kg verstärkt die Wirkung einer Adenosindosis von 100 mg/kg ebenfalls deutlich, während sie auf den Effekt einer Adenosindosis von 50 mg/kg keinen Einfluß zu haben scheint (Tab. 1, Nr. 7 und 8).

Es ist auffällig, daß sich die Wirkungen von 100 mg/kg und 300 mg/kg Adenosin in ihrer Wirkungsstärke nicht unterscheiden (Tab. 1, Nr. 4 und 5), auch nicht in Kombination mit Pyramidon (Tab. 1, Nr. 12 und 13).

Als Beispiel für den Verlauf unserer Verteilungsgeraden und für die Lage unserer Punkte im Wahrscheinlichkeitsnetz zeigen wir die Verteilungsgeraden vor und nach der Injektion von 50 mg/kg Adenosin, von 100 mg/kg Pyramidon und diejenigen vor und nach der Injektion der Kombination dieser Substanzen (Abb. 1).

Während Adenosin sich in seiner Blutdruck-, Temperatur- und Stoffwechselwirkung erheblich von dem Adenosintriphosphat unterscheidet, wirken beide Substanzen in äquimolarer Dosis im Analgesietest etwa gleich, sowohl allein wie auch in Kombination mit Pyramidon. Tab. 2 zeigt die Kennwerte für die mit 10, 50 und 100 mg/kg Adenosin äquimolaren Adenosintriphosphatdosen und die Verschiebungen der Mittenwerte. Die eingeklammerten Werte geben noch einmal die entsprechenden Adenosinwerte an.

Hier möchten wir besonders darauf hinweisen, daß auch 60 min nach der Injektion von Adenosintriphosphat die Reaktionszeiten keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den nach Adenosin erhaltenen zeigen. Es scheint sogar, als ob Adenosintriphosphat in der Kombination mit

Tabelle 2

Nr.	Substanzen: Adenosintriphosphat äquimolar zu einer Adenosindosis von mg/kg	Substanzen: Pyramidon mg/kg	n	Kennwerte (Mittenwerte × Streufaktor±1): 15 min vor Injektion	Kennwerte (Mittenwerte × Streufaktor±1): 15 min nach Injektion	Verschiebung des Mittenwertes in %	
1	50	0	28	4,50 · 1,41±1	4,92 · 1,46±1	9	(12,5)
2	100	0	30	4,50 · 1,33±1	5,67 · 1,44±1	26	(24)
3	10	100	30	3,83 · 1,28±1	4,75 · 1,39±1	24	(11,5)
4	50	100	29	4,55 · 1,25±1	5,80 · 1,29±1	27,5	(46,5)
5	100	100	39	4,50 · 1,24±1	7,10 · 1,56±1	58	(54)

Pyramidon schwächer wirke (Tab. 3). Aus Tab. 3 ist auch ein deutliches Nachlassen der Wirkung gegenüber den 15 min-Werten in Tab. 1 und 2 ersichtlich.

Unser Hinweis erfolgt deshalb, weil die *temperatursenkenden* Wirkungen von Adenosin und Adenosintriphosphat *verschieden sind*. Nach Injektion der gleichen Dosen und bei gleicher Applikationsart wie im Analgesieversuch wirkt das Adenosintriphosphat viel stärker als das

Tabelle 3

Nr.	Substanzen: Adenosin mg/kg	Substanzen: ATP äquimolar zu Adenosin mg/kg	Substanzen: Pyramidon	n	Kennwerte (Mittenwerte × Streufaktor±1): 15 min vor Injektion	Kennwerte (Mittenwerte × Streufaktor±1): 60 min nach Injektion	Verschiebung des Mittenwertes in %
1	100	0	0	40	4,67 · 1,20±1	5,15 · 1,34±1	10
2	0	100	0	30	4,50 · 1,33±1	5,02 · 1,47±1	11,5
3	100	0	100	30	3,90 · 1,48±1	5,00 · 1,66±1	28
4	0	100	100	39	4,50 · 1,24±1	5,10 · 1,43±1	13,5

Adenosin, wie Abb. 2 zeigt. Nach 60 min hat hier Adenosintriphosphat den Höhepunkt seiner Wirkung erreicht, während die an sich schon geringere Adenosinwirkung stark abklingt. Ein weiterer Unterschied der Temperaturwirkung der Adenosinkörper zu ihrer analgetischen Wirkung geht aus Abb. 3 hervor. Die Temperaturwirkung des Adenosins läßt sich nicht wie die analgetische Wirkung durch gleichzeitige Gaben von Pyramidon steigern, obwohl Pyramidon selbst eine ausgeprägte temperatursenkende Wirkung hat.

Das Adenosinmonoacetat wirkt in unserem Test ganz ähnlich wie die beiden anderen untersuchten Adenosinkörper. Die Kennwerte vor und nach der Injektion von 100 mg/kg in Kombination mit Pyramidon 100 mg/kg betragen: $3{,}65 \cdot 1{,}32^{\pm 1}$ bzw. $5{,}00 \cdot 1{,}51^{\pm 1}$. Die Verschiebung des Mittenwertes beträgt demnach 37%. Die etwas stärkere Wirkung des Adenosins und des Adenosintriphosphats kann dadurch erklärt werden, daß 100 mg/kg Monoacetat nicht äquimolar mit der gleichen Adenosindosis ist, sondern eine etwas niedrigere Molarität hat.

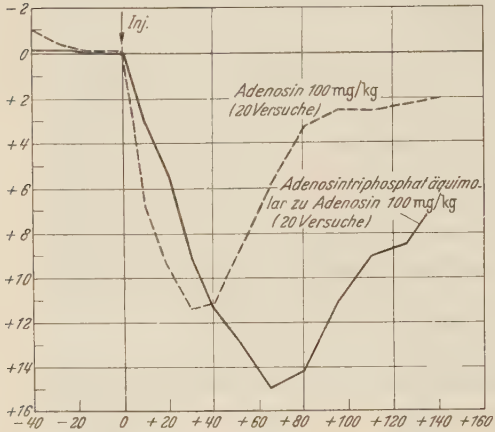


Abb. 2. Temperaturversuche an der Maus mit Adenosin und Adenosintriphosphat. Ordinate: Temperatursenkung in Prozent vom Ausgangswert (Mittelwerte); Abszisse: Minuten nach Injektion

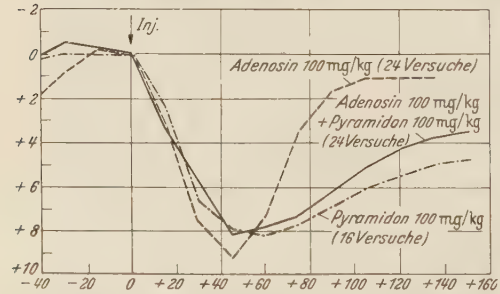


Abb. 3. Temperaturversuche an der Maus mit Adenosin, Pyramidon und einer Adenosin-Pyramidon-Kombination. Ordinate: Temperatursenkung in Prozent vom Ausgangswert (Mittelwerte); Abszisse: Minuten nach Injektion

Das Adenosinmonoacetat[1] ist ein neuartiger Adenosinester, der auf Anregung des einen von uns (R.) von der Firma Zellstoffabrik Waldhof neben zahlreichen anderen Estern synthetisiert wurde. Das Besondere an diesem Ester ist, daß seine Blutdruckwirkung an Katzen zwar 6—30fach schwächer als die von Adenosinmonophosphat ist, jedoch bis zu 10mal länger anhält. Auch gegenüber Adenosin und Adenosintriphosphat wirkt das Präparat schwächer und länger. Die Wirkung des Acetats auf die Coronarien des Meerschweinchenherzens (Langendorff-Präparat) war ebenfalls 10mal schwächer als die des Adenosins. Eine verlängerte Wirkung konnte auch bei der Durchblutungsmessung mit der Thermostromuhr (Typ Oberdorf, Oberdorf u. Wilcke) im Bereich der Haut- und Muskelgefäße beobachtet werden. Auch hier war die Wirkung etwa 10mal schwächer als die von Adenosinmonophosphat. Interessant war, daß die Wirkung auf die Körpertemperatur bei Mäusen (Temperatursenkung nach subcutaner Injektion) etwa die gleiche war wie die von Adenosinmonophosphat bei gewichtsgleicher Dosierung. Da man die Temperatursenkung in erster Linie wohl auf die Gefäßerweiterung in der Haut zurückführen muß, so kann dieser Befund nur bedeuten, daß die schwache Gefäßwirkung des Acetats durch die längere Dauer so auskompensiert wird, daß

[1] Es handelt sich um das Adenosin-5′-acetat (Brown, D. M., L. J. Haynes, u. A. R. Todd: J. Chem. Soc. **1950**, 3299).

im Hinblick auf die träge ablaufende Wärmeverschiebungen im Körper der gleiche Endeffekt erzielt wird (Abhängigkeit des Effektes von Intensität und Zeit). Die Toxicität des Acetats ist ähnlich wie diejenige des Monophosphats sehr gering. Die LD 50 liegt i. p. bei der Maus etwa bei 2 g/kg. Diese Dosis wird s. c. vertragen. Kaninchen vertragen i. v. wiederholte Dosen von 100 mg/kg.

Mit Morphin erzielten wir einen analgetischen Effekt, der in der gleichen Größenordnung lag, wie ihn Gross bei gleicher Dosierung angibt. Wie Tab. 4 zeigt, ließ sich die Morphinwirkung weder durch gleichzeitige Pyramidon- noch Adenosingaben beeinflussen.

Tabelle 4

Nr.	Substanzen			n	Kennwerte (Mittenwerte × Streufaktor±[1])		Verschiebung des Mittenwertes in %
	Morphin mg/kg	Adenosin mg/kg	Pyramidon mg/kg		15 min vor Injektion	15 min nach Injektion	
1	1	0	0	30	4,96 · 1,33±1	5,98 · 1,40±1	20,5
2	1	0	100	39	4,30 · 1,48±1	5,35 · 1,58±1	24,5
3	1	100	0	30	5,18 · 1,27±1	6,22 · 1,49±1	20

Wir versuchten in unseren Kombinationsversuchen einmal das Pyramidon durch ein anderes Kühlkrampfgift zu ersetzen, andererseits verwandten wir statt des Adenosins eine andere gefäßerweiternde Substanz. Durch die Kombination von 100 mg/kg Adenosin und 1 mg/kg Pikrotoxin, einer Dosis, die auf die Körpertemperatur etwa den gleichen Einfluß wie 100 mg/kg Pyramidon hat und die im Analgesietest an sich unwirksam ist, konnte die analgetische Adenosinwirkung nicht verstärkt werden. Die Kombination von 100 mg/kg Pyramidon mit 10 mg/kg Papaverin führte zu keinem klaren Endergebnis, da die erhaltenen Werte so stark streuten, daß wir sie nicht verwenden konnten.

Tabelle 5

Nr.	Substanzen			n	Kennwerte (Mittenwerte × Streufaktor±[1])		Verschiebung des Mittenwertes in %
	Butazolidin mg/kg	Adenosin mg/kg	Pyramidon mg/kg		15 min vor Injektion	15 min nach Injektion	
1	100	0	0	20	3,65 · 1,28±1	3,65 · 1,28±1	0
2	100	50	0	20	3,35 · 1,25±1	3,70 · 1,46±1	10,5
3	100	100	0	20	3,48 · 1,33±1	4,00 · 1,37±1	15
4	100	0	100	39	3,68 · 1,31±1	5,05 · 1,47±1	37

Dagegen gelang es uns, einen ähnlichen Effekt wie bei gleichzeitiger Gabe von Pyramidon und Adenosin mit einer Pyramidonbutazolidinkombination (100 : 100) zu erzielen (Tab. 5). Das Butazolidin war in unserem Test ebenso unwirksam wie Pyramidon. Im Gegensatz zum

Pyramidon war es nicht in der Lage, bei kombinierter Anwendung mit Adenosin einen analgetischen Effekt zu erzielen, der über die Eigenwirkung des Adenosins hinaus ging.

Diskussion

Mit der Methode von Gross stellten wir eine Hemmung der Reflexerregbarkeit durch Adenosin und einige seiner Derivate fest. Wenn wir diese Wirkung als analgetische Wirkung bezeichnen, so haben wir mit Ebbecke eine Zuordnung von nociceptivem Reflex und Schmerz angenommen, und nur in diesem Sinne sind unsere Angaben über analgetische Effekte zu verstehen.

Ob die analgetische Adenosinwirkung zentraler Genese ist, können wir nach unseren Befunden nicht sagen. Es liegt natürlich nahe, die Herabsetzung der Reflexerregbarkeit einfach als eine Kollapsfolge zu deuten. Sie läuft jedoch nicht mit den von uns geprüften peripheren Wirkungen der Adenosinkörper parallel, denn während sich Adenosin, Adenosintriphosphat und Adenosinmonoacetat hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Gefäße, das Herz, den Blutdruck und die Körpertemperatur erheblich unterscheiden, ist ihre analgetische Wirkung in unserem Test praktisch gleich. Allerdings wurde das Adenosinmonoacetat nur in Kombination mit Pyramidon untersucht.

Im Gegensatz zu den Adenosinkörpern war Pyramidon in unserem Test wirkungslos. Über die Nachweisbarkeit einer Pyramidonwirkung in verschiedenen Analgesietesten stehen in der Literatur zahlreiche, zum Teil gegensätzliche Angaben. Eine Übersicht darüber findet sich bei Wirth.

Im Gegensatz zu unseren Befunden erzielten andere Autoren (Friebel, Flick u. Reichle; Wirth, persönliche Mitteilung) mit ähnlicher Methode Ergebnisse, die auf eine analgetische Wirkung des Pyramidons hindeuten. In einem dem Lespagnolschen Verfahren ähnlichen Analgesietest, in dem definierte elektrische Reizung des Mäuseschwanzes als Reizreaktion Piepsen der Tiere auslöst, fanden auch wir eine deutliche reaktionsmindernde Pyramidonwirkung.

Auf jeden Fall ist es so, daß analgetische Pyramidonwirkungen erst bei Anwendung von Dosen gesehen werden, die weit außerhalb des therapeutischen Bereichs liegen. Da es uns nur darauf ankam, die Potenzierung der Adenosinwirkung durch Pyramidon zu beschreiben, ist es für uns belanglos, ob unsere Pyramidondosis eine analgetische Eigenwirkung hatte oder ob sie schon an der Grenze des toxischen Bereichs lag.

Die Potenzierung der Adenosinwirkung durch Pyramidon erschien uns besonders überraschend. Sie gelang uns nicht mit den Kombinationen Pyramidon-Morphin, Morphin-Adenosin, Pikrotoxin-Adenosin und Pyramidon-Papaverin. Das Pikrotoxin verwandten wir anstatt Pyramidon, weil wir nach der Arbeit von Bruns, Hahn u. Schild wissen, daß das Pyramidon hinsichtlich seiner Antipyrese einen ähnlichen oder gleichen Angriffspunkt hat wie das ebenfalls tempertursenkende Pikrotoxin.

Nur die Kombination Pyramidon-Butazolidin, die ja bereits therapeutisch als Irgapyrin der Firma Geigy angewandt wird, zeigte einen starken analgetischen Effekt, obwohl die in der Kombination verwandte Butazolidindosis keine analgetische Eigenwirkung hatte. Es scheint hier jedoch fraglich, ob der Synergismus zwischen Butazolidin und Pyramidon nicht einfach eine Addition unterschwelliger und gleichartiger Wirkungen ist, denn wir haben lediglich die Pyramidon- bzw. Butazolidindosis im Analgesietest geprüft, die wir auch in der Kombination anwandten. Außerdem liegt die von uns benutzte Dosis der Kombination Pyramidon-Butazolidin schon hoch im toxischen Bereich. Wir glauben aber trotzdem an eine potenzierte Wirkung, denn Butazolidin wirkt offenbar nicht gleichartig wie Pyramidon, weil die Kombination von Butazolidin mit Adenosin im Gegensatz zu den Pyramidon-Adenosinkombinationen keine potenzierte Wirkung ergibt.

Zusammenfassung

1. Adenosin, Adenosintriphosphat und Adenosinmonoacetat hemmen die Reflexerregbarkeit im Analgesietest nach GROSS und sind in diesem Sinne analgetisch wirksam.

2. Diese analgetische Wirkung wird durch die gleichzeitige Gabe von Pyramidon potenziert. Pyramidon zeigte in den von uns verwandten Dosen keine analgetische Eigenwirkung.

3. Die analgetischen Wirkungen von Adenosin, Adenosintriphosphat und Adenosinmonoacetat unterscheiden sich im Analgesietest nicht wesentlich, obwohl ihre kardiovasculären Wirkungen und die wahrscheinlich auf Vasodilatation beruhenden Temperaturwirkungen sich erheblich unterscheiden.

4. Der Synergismus Pyramidon-Adenosin läßt sich nicht mit anderen Pyramidonkombinationen (Pyramidon-Morphin, Pyramidon-Papaverin) und anderen Adenosinkombinationen (Adenosin-Pikrotoxin, Adenosin-Morphin) nachahmen. Lediglich die Kombination Pyramidon-Butazolidin zeigt einen ähnlichen Synergismus der Wirkung.

Literatur

BRUNS, F., F. HAHN u. W. SCHILD: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 104 (1950). — DAEVES, K., u. A. BECKEL: Großzahlforschung und Häufigkeitsanalyse. Weinheim u. Berlin: Verlag Chemie 1948. — DRURY, A. N., and A. SZENT-GYÖRGYI: J. of Physiol. **68**, 213 (1929). — EBBECKE, U.: Arzneimittel-Forsch. **1**, 49 (1951). — FRIEBEL, H., H. FLICK u. C. REICHLE: Arzneimittel-Forsch. **4**, 171 (1954). — GOMAHR, H.: Arzneimittel-Forsch. im Druck. — GROSS, F.: Helvet. physiol. Acta **5**, C 31 (1947). — HERBRANDT, W., u. K. H. JAEGER: Das Adenylsäuresystem. Aulendorf i. Württ.: Editio Cantor K. G. 1952. — LESPAGNOL, A., F. MERCIER, J. BERTRAND et J. MERCIER: Ann. Pharmaceut. franç. **8**, 241 (1950). — OBERDORF, A., u. O. WILCKE: Z. exper. Med. **124**, 209 (1954). — WIRTH, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 77 (1952).

Dr. H. GIERTZ, Düsseldorf, Pharmakol. Institut der Med. Akademie

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 34—40 (1956)

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Schoen)

Versuche zur Verhinderung der unter Cholinmangel entstehenden Fettleber durch Behandlung mit Fermenten des Fettstoffwechsels

Von
H. L. Krüskemper und G. Schulze

(Eingegangen am 24. März 1956)

Die bisher vorliegenden Untersuchungen, eine Leberverfettung zu verhindern, gingen von der Voraussetzung aus, mit Hilfe sogenannter lipotroper Substanzen die in der Leber abgelagerten Lipide zu mobilisieren. Da im allgemeinen bei experimentell durch Cholinmangel erzeugter Fettleber die Phosphatidsynthese eingeschränkt ist, hat man den Wirkungsmechanismus lipotroper Substanzen vor allem in einer Steigerung der Phosphatidbildung zu suchen. Eine andere Möglichkeit zur Verhinderung der Leberverfettung besteht darin, Fettablagerungen durch Fermente des Fettstoffwechsels im Sinne eines vermehrten Fettabbaues zu beeinflussen.

Methodik

Als *Versuchstiere* dienten männliche weiße Inzuchtratten mit einem Gewicht zwischen 100 und 150 g. 40 Tiere wurden in 4 Gruppen zu je 10 Tieren in den Versuch genommen. 20 Tiere wurden mit Cholinmangelkost nach Best gefüttert, 20 Tiere dienten als Kontrolle.

Bei je 10 der Versuchs- und Kontrolltiere wurde in zweitägigen Abständen 1 ml eines löslichen *Fermentkomplexes* subcutan injiziert. Behandlungsdauer 24 Tage. Der Fermentkomplex, der unter dem Namen „Vaselastina" im Handel ist, enthält in 2 ml Lösung 20 mg d-Aminosäure-Oxydase, 30 mg Lipoxydase-Citrogenase-Komplex und 20 mg Tyrosinase. Der Lipoxydase-Citrogenase-Komplex soll folgende Fermente enthalten: Fettsäure-Aktivierungs-Enzym, Co-Enzym-A, Citrat-Kondensierungs-Enzym und Zusätze von ATP, DPN, Acetyl-Co-A. Dieser Fermentkomplex wird aus Cruciferensamen gewonnen und seine Aktivität an der Spaltungsgeschwindigkeit von Caprylsäure, welche in Citronensäure übergeht (Datelson u. Mitarb.) gemessen und standardisiert (Hoogerwerf). Die Wirksamkeit des Gesamtkomplexes wird an der durch Cholesterin und Vitamin D_3 erzeugten Ratten-Atherosklerose kontrolliert.

Die *Leberlipidanalysen* wurden adsorptionschromatographisch (an Zucker und Aluminiumoxyd) aus der Lebertrockensubstanz durchgeführt (Schulze u. Südhof).

Die *Gewebsatmung der Leber* wurde an Leberschnitten nach Warburg manometrisch gemessen; p_H 7,2; Medium: Phosphat-Ringer-Glucose. Temperatur: 37,5° C. Angegeben wird der Q_{O_2} (cm^3 O_2-Verbrauch/mg Trockengewebe/60 min).

Die Aktivität der *Cholinoxydase* wurde im Lebervollhomogenat (10%; wäßrig) nach Krüskemper und Dirscherl bestimmt. Aktivitätsangabe: $Q_{O_2}^{Cholin}$: cm^3 O_2-Verbrauch/mg Trockengewebe/30 min).

Die Aktivität der *Cholinesterase* im Serum wurde ebenfalls manometrisch (nach Ammon) gemessen. Aktivitäts-Angabe: cm^3 CO_2-Entwicklung/0,1 ml Serum/30 min.

Die Aktivität der alkalischen *Serumphosphatase* wurde ebenfalls im Lebervollhomogenat nach der Methode von Kirnberger u. Martin gemessen und in King-Armstrong-Einheiten angegeben.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse benutzten wir die bei Pätau angegebene Methode. Berechnet wurde jeweils die Wahrscheinlichkeit p für die Homogenität der verglichenen Werte ($p = > 0{,}05$: nicht signifikant; $p = 0{,}05$ bis 0,01: schwachsignifikant: $p = 0{,}01$—0,001: signifikant; $p = < 0{,}001$: hochsignifikant).

Ergebnisse

Ausgeprägte *toxische Allgemeinerscheinungen* wurden bei den mit dem Fermentgemisch behandelten Tieren vermißt. Das Körpergewicht nahm bei den mangelkostgefütterten Ratten im Vergleich mit den Kontrolltieren geringgradig ab. Die Spontansterblichkeit war in allen Gruppen gleich.

Die *Gewebsatmung der Leber* (Tab. 1) der Mangelkost-Ratten lag am Ende der Versuchsperiode um fast 20% unter der der Kontrollen. Diese Herabsetzung der Atmung konnte durch gleichzeitige Behandlung mit Vaselastina vollständig aufgehoben werden. Vaselastina ließ bei Normalkost den Sauerstoffverbrauch der Leber unbeeinflußt. Im Gegensatz hierzu konnte die für die *Cholinoxydation* gefundene Aktivitätsminderung bei Mangelkost (— 30%, Tab. 1) durch Vaselastina nicht verhindert werden. Auch hier blieb Vaselastina allein ohne Wirkung bei den normal ernährten Tieren. Von den beiden untersuchten Serumfermenten zeigte die *Cholinesterase* weder bei den Mangelkost-Ratten noch bei den mit Vaselastina behandelten Tieren eine signifikante Abweichung von der Norm. Die Aktivität der *alkalischen Serumphosphatase* verhielt sich ähnlich wie die der Cholinoxydase der Leber: unter Bestscher Mangelkost Aktivitätsabnahme um 40% und keine Wirkung von gleichzeitiger Vaselastina-Gabe auf diese Aktivitätssenkung.

Das Verhalten der Lipidfraktionen der Leber ist in Tab. 2b zusammengestellt. Der Gesamtlipidgehalt stieg unter *Mangelkost* um fast 75% an. Für diesen Anstieg war quantitativ in erster Linie eine Zunahme des Neutralfettes verantwortlich. Auch die Cholesterinestermenge stieg auf etwa das 4,5fache unter Mangelkost an, während das freie Cholesterin keine deutlichen Verschiebungen erkennen ließ. Die Fraktionen der Kohlenwasserstoffe und Wachse und der sogenannten unbekannten Substanzen waren nach Mangelkost ebenfalls leicht erhöht (da jedoch über die physiologische Bedeutung dieser Fraktionen nichts bekannt ist, wurde von einer genauen Auswertung abgesehen). Auffallend war, daß in den Lebern der Mangelkost-Tiere keine freien Fettsäuren mehr nachgewiesen werden konnten. Der Phosphatidgehalt blieb unbeeinflußt.

Tabelle 1. *Das Verhalten der Gewebsatmung der Leber, der Cholinoxydase (Leber), der Serum-Cholinesterase und der alkalischen Serum-Phosphatase unter Normalkost,* Best*scher Mangelkost, Normalkost + Vaselastina und Mangelkost + Vaselastina.* (Dosis und Behandlungsdauer sowie die Aktivitätsangaben siehe Methodik)

Gruppe	Leberatmung		Cholinoxydase	Cholinesterase	Phosphatase
1. Normalkost . .			7,2		
	7,1	7,3	8,2	18,0	17,6
	7,4	6,9	6,4	21,0	16,9
	6,4	6,2	8,3	24,5	18,6
	8,0	8,1	6,6	27,5	19,2
	7,0	7,7	4,8	26,0	15,8
M =	7,21		6,92	23,4	17,62
σ_M =	0,198		0,532	—	0,604
2. Mangelkost . .			4,3		9,2
	6,2	6,8	5,2	23,5	9,4
	5,8	5,6	6,1	24,0	12,8
	5,0	5,2	3,9	16,0	14,4
	5,6	6,2	4,5	31,0	7,0
	7,0	6,0	4,8	21,5	9,4
M =	5,94		4,80	23,2	10,36
σ_M =	0,203		0,317	—	1,11
3. Normalkost + Vaselastina .			7,3		12,4
	7,3	7,5	5,8	22,5	12,7
	7,9	8,4	7,1	29,5	6,6
	7,6	7,2	8,1	21,5	7,0
	8,3	8,6	6,9	16,5	24,4
	6,8	7,5	7,8	20,0	13,0
M =	7,71		7,17	21,0	12,70
σ_M =	0,183		0,327	—	2,56
4. Mangelkost + Vaselastina .					11,0
	5,9	5,8	5,4	23,5	10,1
	8,2	8,4	6,2	24,5	10,8
	7,2	7,7	6,2	17,0	10,0
	6,9	7,5	5,1	28,5	14,6
	6,5	6,4	4,4	28,5	9,0
			4,3		6,9
M =	7,25		5,27	24,4	10,34
σ_M =	0,299		0,341	—	0,881

Die beschriebenen Veränderungen konnten durch gleichzeitige *Behandlung der mangelkostgefütterten Tiere mit Vaselastina* zum Teil stark abgeschwächt werden. Eindeutig war dies im Falle der Neutralfette; hier stieg der Gehalt nur auf das Doppelte an, während er bei den unbehandelten Mangelkost-Ratten das 10fache des Normalwertes erreichte.

Dagegen blieb der Phosphatidgehalt in den Lebern von mangelkostgefütterten Tieren und solcher, die gleichzeitig mit Vaselastina behandelt wurden, identisch, ebenso der Gehalt an Estercholesterin. Vaselastina ist also nicht in der Lage, die Anhäufung von Cholesterin-Estern in der Leber unter Cholinmangel zu verhindern. Freie Fettsäuren sind in der Leber unter den Versuchsbedingungen nicht nachweisbar gewesen.

Vaselastina allein bewirkte bei normalgefütterten Tieren keine signifikanten Veränderungen an den Leberlipiden (vgl. Tab. 2b).

Die Mischungsverhältnisse der Leberlipide verhielten sich etwa folgendermaßen (Einzelheiten s. Tab. 2b).

Tabelle 2a

	Phosphatide	Neutralfett	Cholesterinester
Normalkost	10	1	1
Cholinmangel	10	10	5
Normalkost + Vaselastina .	10	1	1
Cholinmangel + Vaselastina	10	2	4,5

Tabelle 2b. *Das Verhalten der Lipidfraktionen der Leber unter Normalkost,* Best*scher Mangelkost, Normalkost + Vasolastine und Mangelkost + Vaselastina* (Dosis und Behandlungsdauer siehe Methodik). Angaben in mg/g Trockengewebe (Absolutwerte) und in Prozent der Gesamt-Lipide

Gruppe	Gesamt-Lipid	Phosphatide	Neutralfette	Cholesterinester	Cholesterin (frei)	Kohlenwasserstoffe und Wachse	unbek. Subst.	freie Fettsäuren
1. Normalkost .	140,5	110,8	7,8	9,1	1,4	8,8	3,2	—
		104,0	9,0	9,6	1,4	6,9	2,4	7,2
	150,8	98,3	19,2	8,7	1,1	11,8	5,7	6,2
		97,5	13,1	10,9	1,6	10,2	5,7	11,8
	147,8	105,2	5,0	12,0	1,0	6,7	8,5	9,3
		103,1	6,9	10,9	1,0	5,5	8,3	12,5
M (abs.)	146,9	103,2	10,2	10,2	1,3	8,3	5,6	9,6
σ_M =	3,08	1,95	2,12	0,52	—	—	—	—
M (rel)		70,6	6,9	7,0	0,9	5,6	3,8	6,3
σM		2,98	1,38	0,32	—	—	—	—
2. Mangelkost . .	290,0	103,5	112,0	57,8	4,4	13,1	12,3	∅
		103,8	107,0	59,7	2,2	16,1	8,3	∅
	247,3	78,6	116,0	38,4	2,8	13,1	14,2	∅
		66,7	130,0	29,7	4,8	17,8	15,9	∅
	228,0	116,1	42,6	50,8	1,7	14,6	13,4	∅
		101,9	62,0	44,0	1,7	13,4	13,5	∅
M (abs.)	255,1	95,1	94,9	46,7	3,0	14,7	12,9	∅
σ_M =	21,0	6,44	14,00	4,74	—	—	—	—
M (rel)		37,6	36,8	18,2	1,1	5,8	5,2	∅
σM		3,47	4,86	1,55	—	—	—	—

Tabelle 2b (Fortsetzung)

Gruppe	Gesamt-Lipid	Phosphatide	Neutralfette	Cholesterinester	Cholesterin (frei)	Kohlenwasserstoffe und Wachse	unbek. Subst.	freie Fettsäuren
3. Normalkost + Vaselastina	155,9	116,6	11,2	5,3	1,5	5,7	2,9	12,6
		115,2	16,0	6,0	1,5	5,8	3,4	7,6
	158,1	116,8	14,5	11,5	1,6	5,0	6,2	2,5
		114,1	11,8	7,8	0,9	6,4	15,8	1,3
	151,2	108,8	10,9	11,5	1,1	9,2	8,9	1,0
		105,1	14,5	12,2	1,3	9,9	8,5	—
M (abs.)	155,0	112,8	13,2	9,1	1,3	7,0	7,6	5,0
σ_M =	2,04	1,82	0,865	1,25	—	—	—	—
M (rel.)		72,7	8,5	5,8	0,9	4,6	4,9	3,2
σM =		0,78	0,52	0,84	—	—	—	—
4. Mangelkost + Vaselastina	206,8	104,9	26,5	42,5	1,3	10,7	27,7	∅
		105,0	25,2	47,2	0,7	14,2	22,2	∅
	214,4	103,7	18,2	61,2	1,4	7,2	12,8	?
		93,5	23,4	62,7	2,1	11,9	22,2	∅
	173,1	86,7	20,8	29,1	2,8	14,4	10,7	?
		95,8	18,4	32,2	1,9	16,4	11,4	∅
M (abs.)	198,1	98,3	22,1	45,9	1,7	12,5	17,8	—
σ_M =	12,7	3,06	1,42	5,80	—	—	—	—
M (rel.)		49,8	11,2	22,7	0,9	6,5	8,9	—
σM =		1,56	0,60	2,08	—	—	—	—

Tabelle 3. *Statistische Auswertung der Ergebnisse.* Gruppen-Numerierung s. Tab. 1—3

Verglichene Gruppen	Phosphatid (rel. %)		Cholesterinester (rel. %)		Neutralfett (rel. %)		Gesamtlipid	
	t	p	t	p	t	p	t	p
1/2	7,2	< 0,001	7,1	< 0,001	5,9	< 0,001	5,1	0,003
1/3	0,7	> 0,1	1,3	> 0,1	1,1	> 0,1	2,2	0,09
1/4	6,1	< 0,001	7,5	< 0,001	2,9	0,015	3,9	0,012
2/3	9,9	< 0,001	7,0	< 0,001	5,8	< 0,001	4,7	0,005
2/4	3,2	0,01	1,7	> 0,1	5,2	< 0,001	2,3	0,07
3/4	13,0	< 0,001	7,5	< 0,001	3,4	0,007	3,3	0,025

	Phosphatide (absolut)		Cholesterinester (absolut)		Neutralfett (absolut)	
	t	p	t	p	t	p
1/2	1,2	> 0,1	7,7	< 0,001	6,0	< 0,001
1/3	3,6	0,005	0,8	> 0,1	1,3	> 0,1
1/4	1,3	> 0,1	6,1	< 0,001	4,7	< 0,001
2/3	2,6	0,03	7,3	< 0,001	5,7	< 0,001
2/4	0,4	> 0,1	0,1	> 0,1	5,2	< 0,001
3/4	4,1	0,002	6,2	< 0,001	5,4	< 0,001

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Verglichene Gruppen	Leberatmung		Cholinoxydase		Phosphatase	
	t	p	t	p	t	p
1/2	4,5	$< 0{,}001$	3,4	0,007	5,8	$< 0{,}001$
1/3	1,9	0,7	0,4	$> 0{,}1$	1,9	0,1
1/4	0,1	$> 0{,}1$	2,6	0,025	6,8	$< 0{,}001$
2/3	6,5	$< 0{,}001$	5,2	$< 0{,}001$	0,8	$> 0{,}1$
2/4	3,6	0,002	1,0	$> 0{,}1$	0,1	$> 0{,}1$
3/4	1,3	$> 0{,}1$	4,0	0,002	0,9	$> 0{,}1$

Besprechung der Ergebnisse

Beim normal ernährten Tier kommt es unter der Wirkung von „Vaselastina" außer zu einer geringen Zunahme der Leberlipide sonst zu keinerlei signifikanten Veränderungen an den Leberlipiden und den untersuchten Fermentaktivitäten in Leber und Serum. Unter Cholin-Mangelkost nach BEST häufen sich in der Leber, wie mehrfach beschrieben Fettsubstanzen an, insbesondere Neutralfett und Cholinesterinester, unter relativer Abnahme der Phosphate, d. h. das Mischungsverhältnis der Leberlipide wird zugunsten von Neutralfett und Cholesterinestern und zu ungunsten der Phospholipide verschoben. Die Leberatmung und die von uns untersuchten Fermentaktivitäten sind dabei herabgesetzt, wobei sich die Senkung der Cholinoxydation als Anpassungserscheinung an den bestehenden Cholinmangel erklären läßt. Wenn der unter Cholinmangelkost stehenden Tieren während der Versuchsdauer das Präparat injiziert wird, zeigen die Veränderungen rückläufige signifikante Bewegungen in dem Sinne, daß es vor allem zu einer Neutralfettabnahme kommt, ohne daß der Phospholipidgehalt absolut oder relativ vermehrt würde. Dieser Vorgang geht mit Normalisierung der Sauerstoffaufnahme einher; die untersuchten Fermentaktivitäten zeigen indessen keine Normalisierung. Wie der Vergleich der Versuchsgruppen 1 und 4 der Tab. 2b zeigt, findet man an den mit Mangelkost und Fermentkomplex behandelten Tieren jedoch keine normalen Lipid- und Fermentaktivitätsverhältnisse in der Leber. Die durch Cholinmangel induzierte Leberverfettung der Ratte kann demnach durch Vaselastina zwar weitgehend, aber nicht völlig verhindert werden. Auffallend ist das Verhalten der alkalischen Phospataseaktivität im Serum, deren Depression bei Cholinmangel durch den gegebenen Fermentkomplex nicht beeinflußt wird. Es entsteht der Eindruck, als ob durch den Fermentkomplex die Aktivität dieses Fermentes gesenkt würde (die gefundenen Unterschiede sind jedoch nicht signifikant).

Die gefundene Wirkung dürfte sich auf den im Präparat enthaltenen Lipoxydase-Citrogenase-Komplex zurückführen lassen. Die in dem Präparat außerdem enthaltenen Fermentkomplexe des Eiweißstoffwechsels

wurden auf ihre Wirksamkeit nicht geprüft. Die Wirkung des Lipoxydase-Citrogenase-Komplexes pflanzlicher Herkunft bezieht sich an der durch Cholinmangel induzierten Fettleber der Ratte auf einen vermehrten Abbau von Neutralfett unter Normalisierung des Sauerstoffverbrauches, ohne daß man unter unseren Versuchsbedingungen eine vermehrte Phosphatidsynthese nachweisen könnte. Gegen die etwaige Annahme einer verminderten Neutralfallbildung spricht der gegenüber den nicht behandelten Tieren vermehrte Sauerstoffverbrauch. Damit ist die Wirkung des untersuchten Fermentkomplexes prinzipiell verschieden von der Wirkungsweise der sogenannten lipotropen Substanzen, welche die Umwandlung von Neutralfett in Phospholipide anregen.

Weiterhin ist bemerkenswert, daß unter normalen Ernährungsbedingungen keine Wirkung des Fermentkomplexes beobachtet werden konnte. Erst unter Bedingungen, die zu einer vermehrten Fettablagerung in der Leber führen, kam es zu dem beobachteten oxydativen Fettabbau. Das läßt den Schluß zu, daß der benutzte pflanzliche Fermentkomplex im tierischen Organismus, ähnlich wie die ortsgebundenen Fermente des Organismus in seiner Wirkungsweise abhängig sein wird von der Lage des Substratgleichgewichtes.

Zusammenfassung

1. Durch subcutane Verabfolgung eines Komplexes von Fermenten des Fettstoffwechsels (Vaselastina) wird die unter Cholinmangel bei Ratten eintretende Leberverfettung bezüglich der Neutralfette fast vollständig verhindert, während der Gehalt der Leber an Phosphatiden und Cholesterinestern unbeeinflußt bleibt; gleichzeitig wird der bei Leberverfettung herabgesetzte Sauerstoffverbrauch der Leber normalisiert. Die Veränderungen der Aktivität der Cholinoxydase, der alkalischen Serumphosphatase und -Cholinesterase werden nicht beeinflußt.

2. Normale Ratten zeigen nach Behandlung mit Vaselastina keine Abweichungen der Leberlipide und der untersuchten Fermentaktivitäten von der Norm.

Literatur

Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 406 (1933). — Hoogerwerf, S.: Geneesk. Gids **33**, 5 (1955). — Kirberger, E., u. G. Martin: Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 268 (1950). — Krüskemper, H. L., u. W. Dirscherl: Biochem. Z. **323**, 512 (1953). — Natelson, S., J. B. Primus and J. K. Lugovoy: J. of Biol. Chem. **175**, 745 (1948). — Schulze, G., u. H. Südhof: Pflügers Arch. **258**, 211 (1953).

Dr. H. L. Krüskemper u. Dr. G. Schulze, Göttingen, Med. Univ.-Klinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 41—51 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Verminderung des Wirksamkeitsunterschiedes optischer Isomere mit steigender Konzentration* **

Von
Wolfgang Schaumann

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1956)

Es ist seit langem bekannt, daß optisch isomere Verbindungen sich in ihren physiologischen und pharmakologischen Wirkungen sowohl quantitativ als qualitativ voneinander unterscheiden können. Cushny faßte 1926 die bis dahin bekannten Unterschiede zusammen. Er kam zu dem Schluß, daß es keine allgemeine Gesetzmäßigkeit gibt, die vorauszusagen erlaubt, welches Isomere bei einer bestimmten Reaktion bevorzugt wird. Es lag nahe, beim Bestehen großer Wirksamkeitsunterschiede zwischen den optischen Isomeren eines Pharmakons einen anderen Wirkungsmechanismus anzunehmen als bei gleicher Wirksamkeit. So benutzte z. B. Kroneberg (1955) die schon von Cushny (1920) gemachte Beobachtung, daß die *periphere* Wirkung des L-Hyoscyamins, nicht aber seine *zentrale* Wirkung weit stärker ist als die des D-Hyoscyamins, um den Mechanismus der Atropinwirkung in verschiedenen Versuchsanordnungen als „peripher" oder „zentral" zu kennzeichnen.

In der vorliegenden Arbeit soll am Beispiel des *Methadons* und des *Hyoscyamins* gezeigt werden, daß der Unterschied in der Wirkungsstärke der optischen Isomeren wesentlich von der Konzentration abhängt, in der sie wirksam sind.

Methoden

Meerschweinchen von 200—250 g wurden durch Genickschlag getötet, entblutet und ein etwa 4 cm langes Stück vom unteren Ileum, mindestens 10 cm von der Ileocöcalklappe entfernt, entnommen. Die Präparate wurden bei 36—37° C in 3,5—6 ml Mg-freier Tyrode-Lösung suspendiert und das Bad mit 95% O_2 + 5% CO_2 durchperlt. Manche Präparate kamen erst nach 2—6stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank zur Verwendung; ihre Empfindlichkeit gegen Nicotin, Acetylcholin und Histamin war gegenüber den frischen Darmstücken nicht vermindert. Zur elektrischen Reizung wurden nur frische Präparate verwendet.

Nicotin wurde alle 3 min, *Acetylcholin* und *Histamin* alle 90 sec gegeben und nach 20 bzw. 15 sec langer Einwirkung durch Überlauf ausgewaschen.

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
** Meinem Vater zum 65. Geburtstag gewidmet.

Die *elektrische Reizung* des Darmes erfolgte nach der Methode von Paton (1955a). Der Darm wurde unten über ein Glasrohr gezogen und festgebunden. Zwei Platindrähte von 5 cm Länge wurden als Elektroden benutzt. Der eine hing parallel zum Darm außen in der Badflüssigkeit, der andere wurde in das Darmlumen eingebunden und ragte unten in das Glasrohr als Führung, so daß der Darm sich frei nach oben und unten bewegen konnte. Ein angelöteter isolierter Kupferdraht diente zugleich zur Aufhängung des Präparates an einem kupfernen Schreibhebel und zur Zuführung des Stromes. Gereizt wurde mit Rechteckimpulsen von 60 bis 100 Milliamp., 0,5—20 msec Dauer und einer Frequenz von 3 oder 6 Impulsen/min. Die Hemmwirkung von *Methadon* und *Hyoscyamin* wurde bei supramaximaler Reizstärke bestimmt.

Zur Bestimmung der Konzentration, die eine Kontraktion auf die Hälfte reduzierte (EC_{50}), wurde je eine Konzentration von Methadon[1] bzw. Hyoscyamin[1] gesucht, die eine etwas schwächere bzw. eine etwas stärkere Hemmung verursachte, und logarithmisch die Konzentration errechnet, die einer Reduktion um 50% entsprechen würde. So wurde in Abb. 1 für L-Methadon eine EC_{50} von $2{,}8 \times 10^{-9}$ und für D-Methadon eine EC_{50} von $4{,}2 \times 10^{-8}$ ermittelt. Daraus ergab sich ein Verhältnis $EC_{50}D : EC_{50}L$ von 15.

Abb. 1. Bestimmung der EC_{50} von L- und D-Methadon. Meerschweinchen-Ileum in 4 ml Tyrode-Lösung. Kontraktionen durch 8,5 μg Nicotin alle 3 min. Die Zahlen bedeuten μg L-Methadon (L-M) bzw. D-Methadon (D-M)

In den Versuchen mit *elektrischer Reizung* wurde ausgewaschen, wenn die Hemmwirkung ein Maximum erreicht hatte. Bei Erregung des Darmes mit *Nicotin*, *Acetylcholin* oder *Histamin* wurde, wenn nicht anders angegeben, die Reduktion der zweiten Kontraktion nach Zugabe der Hemmstoffe gemessen (s. Abb. 1), was meistens dem Maximum der Wirkung entsprach.

Die Konzentrationen von Nicotintartrat, Acetylcholinchlorid und Histamindihydrochlorid sind als μg/ml der Salze, die von L- und D-Methadonhydrochlorid, L-Hyoscyaminbase und D-Hyoscyaminsulfat als μg/ml der Basen angegeben. Die Lösungen der optischen Isomeren von Methadon und Hyoscyamin wurden täglich frisch hergestellt.

Ergebnisse

1. L- und D-Methadon

In 60 Versuchen wurde der Darm durch *Nicotin*, *elektrische Reizung*, *Acetylcholin* oder *Histamin* zur Kontraktion gebracht und die EC_{50} von L- und D-Methadon bestimmt. Die Mittelwerte wurden logarithmisch errechnet und sind zusammen mit den Grenzen für 95% Wahrscheinlichkeit in Tab. 1 angegeben. Die Mittelwerte für das Verhältnis gleich wirksamer Konzentrationen von L- und D-Methadon und deren

[1] Für die Überlassung von L- und D-Methadon (Polamidon EWZ) bin ich Herrn Prof. Ehrhart, von D-Hyoscyamin Herrn Doz. Kroneberg sehr zu Dank verpflichtet.

Vertrauensgrenzen wurden ebenfalls logarithmisch aus den Ergebnissen der einzelnen Versuche bestimmt. Das entspricht dem methodischen Vorgehen, da an jedem Präparat die EC_{50} beider Isomeren bestimmt wurde. Eine Berechnung aus den Mittelwerten für L- und D-Methadon wäre nur bei Bestimmung der Hemmwirkung der Isomeren in zwei getrennten Versuchsreihen geboten und würde die Streuung der Resultate größer angeben, als den Tatsachen entspricht.

Frühere Untersuchungen hatten ergeben, daß am Meerschweinchenileum die nach *Nicotin* auftretenden Kontraktionen durch dieselben Konzentrationen von Morphin und Atropin unterdrückt werden wie die Vorbereitungs- und Entleerungsphase der Peristaltik. Das Verhältnis gleich wirksamer Dosen Morphin : Atropin betrug gegen Nicotin etwa 5 : 1 (W. Schaumann 1955). Ein Vergleich von Tab. 1 mit Tab. 2 zeigt, daß L-Methadon gegen Nicotin nur etwa 2mal schwächer wirkt als L-Hyoscyamin. Es handelt sich also bei der Hemmung der Nicotin-Kontraktionen um

Tabelle 1. *Die Hemmung elektrisch und pharmakologisch ausgelöster Darmkontraktionen durch L- und D-Methadon (Polamidon)*

Erregung des Darmes durch		Zahl der Versuche	EC_{50} µg/l		$EC_{50}D : EC_{50}L$
			L-Methadon	D-Methadon	
Nicotin	$1{,}4—2{,}3 \cdot 10^{-6}$	17	2,5 (1,95—3,3)	47,5 (34—66)	19 (15—23)
elektr. Reizung		11	8,0 (3,3—19)	121 (62—234)	15 (10—23)
Nicotin	$0{,}8—1 \cdot 10^{-5}$	14	27 (18,5—39)	216 (171—276)	8 (6,6—10)
Acetylcholin	$0{,}7—2 \cdot 10^{-8}$	9	1130 (685—1880)	2020 (1360—3010)	1,8 (1,55—2,05)
Histamin	$2{,}5—4 \cdot 10^{-8}$	9	1920 (1680—2200)	2190 (1750—2740)	1,14 (1,0—1,3)

Tabelle 2. *Die Hemmung elektrisch und pharmakologisch ausgelöster Darmkontraktionen durch L- und D-Hyoscyamin*

Erregung des Darmes durch		Zahl der Versuche	EC^{50} µg/l		$EC_{50}D : EC_{50}L$
			L-Hyoscyamin	D-Hyoscyamin	
Acetylcholin	$0{,}4—7 \cdot 10^{-9}$	13	0,6 (0,36—0,96)	54 (36— 80)	92 (72—120)
Nicotin	$1 —1{,}25 \cdot 10^{-6}$	10	1,1 (0,9—1,4)	86 (66—110)	79 (60—107)
elektr. Reizung		10	5,0 (2,9—8,5)	120 (90—160)	24 (15— 40)

eine spezifische Wirkung der morphinähnlichen Analgetica. L-Methadon war im Durchschnitt 19mal wirksamer als D-Methadon (Tab. 1). Das stimmt gut mit dem Verhältnis von 15 : 1 überein, das O. SCHAUMANN, M. GIOVANNINI u. K. JOCHUM (1952) für die Wirkung der beiden Isomeren auf den Peristaltikreflex fanden. Eine 5fache Erhöhung der Nicotin-Konzentration hatte eine 5fache Erhöhung der EC_{50} von D-Methadon, aber eine 10fache Zunahme der EC_{50} von L-Methadon zur Folge, so daß jetzt ein Wirksamkeitsverhältnis von 8 resultierte (Tab. 1).

In den Versuchen mit *elektrischer Reizung* nahm die EC_{50} für L- und D-Methadon wider Erwarten nicht mit der Reizstärke zu. Die starke

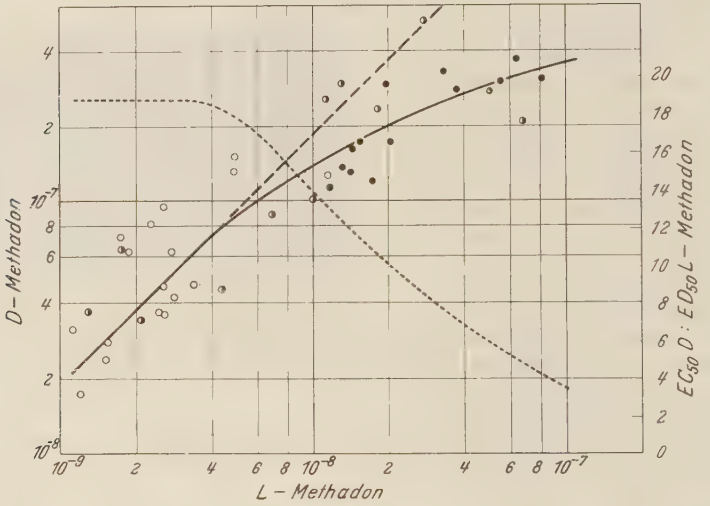


Abb. 2. Vergleich der EC_{50} von L- und D-Methadon. Abszisse: Konzentration von L-Methadon. Linke Ordinate: Konzentration von D-Methadon. Rechte Ordinate und punktierte Linie: Verhältnis $EC_{50}D : EC_{50}L$-Methadon. Jeder Punkt entspricht der EC_{50} von L- und D-Methadon in einem Versuch gegen Kontraktionen durch ○ Nicotin 1,4—2,3 · 10^{-8}; ◐ elektrische Reizung; ● Nicotin 0,8 bis 1 · 10^{-5}. — — — Theoretisch zu erwartende Gerade bei einem konstanten Verhältnis D : L von 19; ——— den Ergebnissen entsprechende Kurve

Streuung der Resultate beruhte auf der stark schwankenden Empfindlichkeit der Präparate gegen Methadon bei Verwendung hoher Reizstärken. Die Mittelwerte der EC_{50} und das mittlere Verhältnis $EC_{50}D : EC_{50}L$ haben daher hier wenig Bedeutung, doch passen sich die einzelnen Bestimmungen gut in die Ergebnisse mit Nicotin ein, wie aus Abb. 2 hervorgeht.

Die Abb. 2 stellt den *kontinuierlich abnehmenden Wirkungsunterschied* zwischen L- und D-Methadon mit steigender EC_{50} graphisch dar. Auf der Abszisse sind die EC_{50} von L-Methadon, auf der Ordinate die EC_{50} von D-Methadon in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Jeder Punkt wurde durch die Bestimmung der EC_{50} beider Isomeren in einem Versuch

gewonnen (s. Abb.1). Bliebe das Verhältnis $EC_{50}D : EC_{50}L$ in den verschiedenen Konzentrationen konstant, so müßten alle Punkte an einer Geraden liegen, die im Winkel von 45° ansteigt. Die gestrichelte Linie in Abb. 2 entspricht einem Verhältnis $EC_{50}D : EC_{50}L$ von 19, wie es im Mittel gegen Nicotin $1—2 \cdot 10^{-6}$ gefunden wurde. Im Bereich niederer Konzentrationen von Methadon ist die Übereinstimmung gut, mit zunehmender EC_{50} weichen die Ergebnisse jedoch signifikant von der eingezeichneten Geraden ab. Am besten entspricht ihnen eine nach oben konvexe Kurve. Aus dieser Kurve läßt sich die allmähliche Abnahme des Wirkungsunterschiedes ablesen, wie sie in Abhängigkeit von der EC_{50} für L-Methadon durch die punktierte Linie in Abb. 2 gekennzeichnet ist

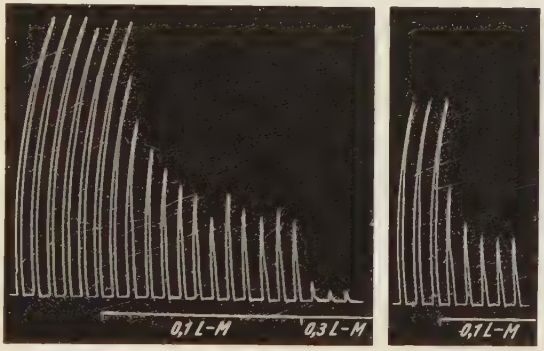


Abb. 3. Verzögerter Eintritt der Wirkung von Methadon gegen Kontraktionen durch Nicotin. Meerschweinchen-Ileum in 4,5 ml Tyrode-Lösung, 43 µg Nicotin alle 3 min. Die Zahlen bedeuten µg L-Methadon. Die zweite Bestimmung (b) erfolgte 30 min nach der ersten (a)

Nicotin löste in den höheren Konzentrationen (10^{-5}) gut reproduzierbare Kontraktionen aus, die um 50% stärker waren als bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$. Abb. 3 zeigt, daß die Wirkung auch der höheren Nicotindosen keine direkt *muskuläre* Komponente hat. Zwar verursachte Nicotin auch nach mehr als halbstündiger Einwirkung von 0,1 µg L-Methadon noch eine geringe Kontraktion; diese konnte jedoch durch Erhöhung der Methadon-Konzentration auf das Dreifache prompt beseitigt werden. Wäre die restliche Erregbarkeit z. B. auf eine acetylcholinartige Wirkung zurückzuführen, so dürfte sie sich nur durch viel höhere Konzentrationen von Methadon beseitigen lassen (Tab. 1).

Bei den Versuchen mit hohen Dosen Nicotin ergab sich eine methodische Schwierigkeit (Abb. 3). Die Lähmung durch Methadon war in manchen Versuchen nicht nach 2 Kontraktionen maximal, sondern erst nach etwa 7 Kontraktionen. Dieser verzögerte Eintritt der Wirkung wurde aber nur bei der ersten Bestimmung beobachtet. Bei der zweiten Bestimmung war die Lähmung schon nach 2 Kontraktionen annähernd maximal (Abb. 3b). Die Empfindlichkeit blieb dabei unverändert. In Abb. 3a reduzierten 0,1 µg L-Methadon die Kontraktionen um 67%, in Abb. 3b um 61%. Um reproduzierbare Resultate zu erhalten, wurde deshalb in den Versuchen

mit hohen Dosen Nicotin die erste Bestimmung verworfen und bei den folgenden Bestimmungen die Reduktion der zweiten Kontraktion gemessen. Es wurden nur Versuche ausgewertet, bei denen sich die Empfindlichkeit auch später nicht änderte. Durch wiederholte Anwendung derselben Dosis war das leicht zu kontrollieren. Unter Beachtung dieser Vorsichtsmaßregeln ließen sich befriedigende Resultate erzielen.

Methadon hat in hohen Konzentrationen auch eine „spasmolytische" Wirkung, die jedoch nicht spezifisch für die morphinähnlichen Analgetica ist (O. Schaumann, M. Giovannini u. K. Jochum 1952). Trotzdem war L-Methadon gegen *Acetylcholin* 1,8mal wirksamer als D-Methadon. Ein Unterschied zwischen den Isomeren wurde in allen Versuchen gefunden und ist statistisch gesichert. Dabei kann es sich nicht um eine Verunreinigung des D-Methadon mit einer indifferenten Substanz gehandelt haben, sonst hätte sich derselbe Unterschied auch gegen *Histamin* ergeben müssen. Bei den Versuchen mit Histamin wurden jeweils gleiche Konzentrationen der Isomeren miteinander verglichen. Meistens war L-Methadon etwas wirksamer, doch war der Unterschied gegen D-Methadon im Durchschnitt nicht signifikant.

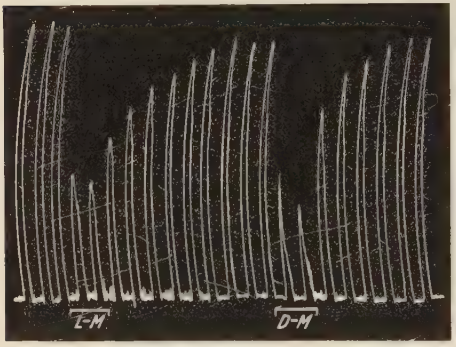


Abb. 4. Langsame Reversibilität der Wirkung von L-Methadon, schnellere Reversibilität der Wirkung von D-Methadon. Meerschweinchen-Ileum in 4 ml Tyrode-Lösung, Kontraktionen durch 43 μg Nicotin alle 3 min. L-M: 0,1 μg L-Methadon, D-M: 0,8 μg D-Methadon

Aus Abb. 1 geht hervor, daß die *Wirkung von L-Methadon schneller* eintrat als die von D-Methadon. Die erste Nicotin-Kontraktion nach Zugabe von L-Methadon war schon nahezu so stark abgeschwächt wie die zweite, während bei D-Methadon die Wirkung erst zu etwa 50% eingetreten war. Umgekehrt war L-Methadon in den Versuchen mit Nicotin schwerer auswaschbar. In dem Versuch der Abb. 4 hatten 0,1 μg L-Methadon und 0,8 μg D-Methadon eine gleichstarke Wirkung, doch war die des L-Isomeren viel schlechter reversibel. Die Hemmung der Acetylcholin und Histaminkontraktionen war dagegen bei den beiden optischen Antipoden gleich schnell auswaschbar.

2. L- und D-Hyoscyamin

In 33 Versuchen wurden die EC_{50} von L- und D-Hyoscyamin gegen Kontraktionen durch *Acetylcholin*, *Nicotin* und *elektrische Reizung* bestimmt. Die Mittelwerte und die Grenzen für 95% Wahrscheinlichkeit sind in Tab. 2 angegeben.

Die hohe Empfindlichkeit der *Nicotin*-Kontraktionen des Meerschweinchen-Dünndarmes gegen Atropin ist bekannt. Dem entspricht,

daß die EC_{50} von L-Hyoscyamin gegen Nicotin kaum doppelt so hoch ist wie gegen gleichwirksame Acetylcholindosen. Bei D-Hyoscyamin bestand gerade noch eine signifikante Differenz. Das Verhältnis der EC_{50}D : EC_{50}L-Hyoscyamin war deshalb gegen Nicotin etwas kleiner als gegen Acetylcholin, doch lag der Unterschied innerhalb der Fehlergrenze.

Bei der *elektrischen Erregung* des Darmes wurde mit maximaler Stärke bei einer Impulsdauer von 0,5 msec und einer Frequenz von 0,1 Imp/sec gereizt. Die Ergebnisse streuten bei dieser kurzen Impulsdauer weniger als bei der langen in den Versuchen mit Methadon. Die EC_{50} für L-Hyos-

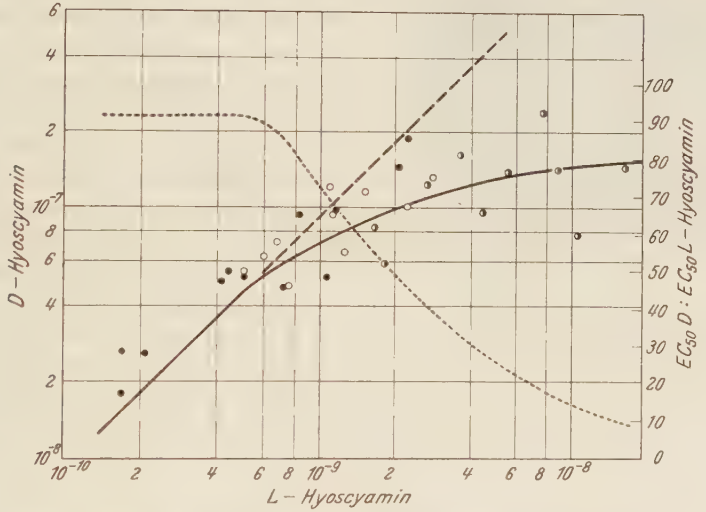


Abb. 5. Vergleich der EC_{50} von L- und D-Hyoscyamin. Kontraktionen durch • Acetylcholin, ○ Nicotin und ◑ elektrische Reizung. Beschriftung wie in Abb. 2

cyamin lag im Mittel fast 5mal höher als in den Versuchen mit Nicotin, die für D-Hyoscyamin nur 1,5mal; das Wirksamkeitsverhältnis zwischen den optischen Antipoden war signifikant kleiner (Tab. 2).

Aufschlußreicher als der Vergleich der Mittelwerte ist auch hier die graphische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse (Abb. 5). Die Werte der Versuche mit Acetylcholin liegen annähernd an der eingezeichneten Geraden, die einem konstanten Verhältnis von 92 entspricht, wie es im Mittel gegen Acetylcholin gefunden wurde. Schon in den Versuchen mit Nicotin, besonders deutlich aber in denen mit elektischer Reizung kommt es bei der Eintragung der Ergebnisse zu einer Abweichung von dieser Geraden. Wie in den Versuchen mit Methadon liegen alle Punkte an einer nach oben konvexen Kurve, wobei die Resultate mit den verschiedenen Methoden der Erregung des Darmes fließend ineinander übergehen.

Im Gegensatz zu den optischen Isomeren von Methadon trat die *Wirkung von L-Hyoscyamin langsamer* ein als die von D-Hyoscyamin. Im Versuch der Abb. 6 waren 0,16 μg D-Hyoscyamin und 0,03 μg L-Hyoscyamin gleichwirksam gegen elektrische Reizung, doch erreichte die Wirkung von D-Hyoscyamin schon nach 90 sec ihr Maximum, die von L-Hyoscyamin erst nach 4,5 min. Derselbe Unterschied war gegen Acetylcholin zu sehen, wenn auch nicht so deutlich, da nur alle 90 sec eine Kontraktion ausgelöst wurde. Daher wurde darauf geachtet, daß L-Hyoscyamin lange genug einwirken konnte, um seine maximale Wirkung zu erreichen. Der langsamere Eintritt der Wirkung von L-Hyoscyamin war nur bei den stärkeren Verdünnungen zu sehen, in denen das L-Isomere schon wirksam ist. Im Bereich der Konzentrationen von D-Hyoscyamin trat die Wirkung schneller ein. Ein Maximum konnte dann nicht mehr beobachtet werden, da die Kontraktionen vollständig unterdrückt wurden. Nicotin gegenüber, das nur alle 3 min gegeben wurde, war kein Unterschied in der Geschwindigkeit des Wirkungseintritts von L- und D-Hyoscyamin feststellbar. — Die Wirkung von L-Hyoscyamin war schlechter auswaschbar als die von D-Hyoscyamin.

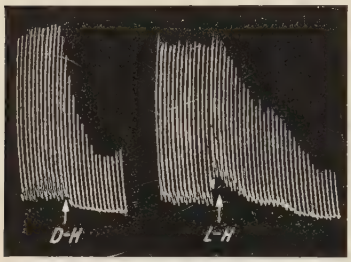


Abb. 6. Langsamerer Eintritt der Wirkung von L-Hyoscyamin. Meerschweinchen-Ileum in 6 ml Tyrode-Lösung. Kontraktionen durch elektrische Reizung mit Rechteckimpulsen von 80 Milliamp. und 0,5 msec alle 10 sec. D-H: 0,16 μg D-Hyoscyamin, L-H: 0,03 μg L-Hyoscyamin

Diskussion

Die Hemmungswirkung von *Methadon* auf elektrisch und durch Nicotin ausgelöste Kontraktionen des Meerschweinchen-Dünndarmes kommt anscheinend über denselben Mechanismus zustande wie die Lähmung der Peristaltik. Wie die Lähmung des Peristaltikreflexes (O. Schaumann, M. Giovannini u. K. Jochum 1952), so geht auch die Hemmung der Darmkontraktionen bei elektrischer Reizung der analgetischen Wirksamkeit der morphinähnlichen Analgetica parallel (Paton 1955b). Die Lähmung der Nicotin-Kontraktionen beruht ebenfalls auf einer spezifischen Wirkung der Analgetica (W. Schaumann 1955). Das trifft auch für hohe Nicotindosen zu. Um deren Kontraktionswirkung zu hemmen, sind zwar höhere Konzentrationen von Methadon — und Morphin (unveröffentlichte Versuche) — erforderlich; die zur vollständigen Unterdrückung der Erregungswirkung hoher Nicotindosen ausreichende Methadondosis liegt aber weit unter der spasmolytisch wirksamen. *Morphin* wirkt überhaupt nicht spasmolytisch. Auch das spricht dafür, daß in der darmerregenden Wirkung hoher Nicotinkonzentrationen keine direkt muskuläre Komponente enthalten ist.

Wenn demnach anzunehmen ist, daß der Hemmungswirkung des Methadons sowohl auf die elektrisch als auf die durch kleine und große Nicotindosen ausgelösten Darmkontraktionen der gleiche Mechanismus zugrunde liegt, trotzdem aber das Wirksamkeitsverhältnis zwischen L- und D-Methadon in den 3 Fällen verschieden ist, so kann die Ursache dieses Wirksamkeits*unterschiedes* nicht in einem verschiedenen Wirkungs*mechanismus* liegen. Das Wirksamkeitsverhältnis der beiden optischen Antipoden scheint vielmehr, wie besonders deutlich aus der Abb. 2 hervorgeht, konzentrationsabhängig zu sein, — derart, daß der Wirksamkeitsunterschied um so kleiner wird, je höher die für die Hemmungswirkung erforderlichen Konzentrationen sind.

Im Einklang hiermit stehen die Versuchsergebnisse mit L- und D-*Hyoscyamin*. Wenn man es mit Ambache (1955) für erlaubt hält, jede Atropinwirkung, die schon in geringen Konzentrationen auftritt, mit einem Antagonismus gegen Acetylcholin zu erklären, so würde die Hemmungswirkung des Hyoscyamins nicht nur gegen die durch Acetylcholin, sondern auch gegen die durch Nicotin und elektrische Reizung verursachten Darmkontraktionen wahrscheinlich auf seiner „antimuscarinartigen" Wirkung beruhen. Der Wirkungsmechanismus wäre dann wie in den Versuchen mit Methadon so auch in denen mit Hyoscyamin derselbe. Trotzdem nahm auch hier der Unterschied in der Wirksamkeit der Isomeren mit steigender Konzentration allmählich ab (vgl. Abb. 5). *Demnach darf aus Unterschieden im Wirksamkeitsverhältnis zweier optischer Isomere nicht auf verschiedene Wirkungsmechanismen geschlossen werden.*

Auch wenn eine Substanz an dem *einen* Versuchsobjekt in niederen, an einem *anderen* erst in hohen Konzentrationen wirkt, so kann man daraus nicht mit Sicherheit schließen, daß der Wirkungsmechanismus in beiden Fällen verschieden sein muß. Am Meerschweinchenileum werden Acetylcholin-Kontraktionen durch sehr geringe Konzentrationen von Atropin aufgehoben, am Froschrectus erst durch viel höhere (Riesser u. Neuschlosz 1921) und am nervenfreien Blutegelpräparat gar nicht (Minz 1932). Festgestellt ist damit nur eine verschiedene Empfindlichkeit der Acetylcholin-Receptoren gegen Atropin, nicht ein verschiedener Wirkungsmechanismus. Der Unterscheidung einer „muscarinartigen" und einer „nicotinartigen" Wirkung von Acetylcholin würde deshalb unter diesem Gesichtspunkt eine gewisse Willkür anhaften (Abdon 1940).

Anscheinend können empfindliche Receptoren gut zwischen den optischen Isomeren unterscheiden, unempfindliche schlecht oder gar nicht. Dementsprechend unterscheiden sich die Isomeren von Atropin am Meerschweinchenileum sehr stark, am eserinisierten Froschrectus in Konzentrationen von 10^{-8} ebenfalls gut (Abdon 1940), am nichteserinisierten in

Konzentrationen um 10^{-3} dagegen nicht (Kroneberg 1955), ohne daß man daraus einen verschiedenen Wirkungsmechanismus ableiten dürfte. Am Kaninchendarm können Nicotin-Kontraktionen erst durch hohe Konzentrationen Atropin gehemmt werden. Kroneberg (persönl. Mitteilung) fand an diesem Präparat keinen sicheren Unterschied zwischen den optischen Isomeren, was in eigenen Versuchen bestätigt werden konnte. Dagegen war der Unterschied zwischen L- und D-Hyoscyamin in den niederen Konzentrationen, die gegen Acetylcholin-Kontraktionen wirksam sind, annähernd derselbe wie am Meerschweinchen-Dünndarm. Trotz der nur schwachen und sicher unspezifischen Wirkung gegen Acetylcholin fand sich in den Versuchen mit Methadon ein geringer Unterschied zwischen den Isomeren. Während Thorp (1949) L- und D-Methadon am Darm gegen Doryl und Barium gleich wirksam fand, war L-Methadon in den eigenen Versuchen etwas wirksamer gegen Acetylcholin als D-Methadon, während gegen Histamin kein signifikanter Unterschied mehr bestand. Die Diskrepanz könnte darauf beruhen, daß in den eigenen Versuchen 7mal geringere Methadon-Konzentrationen zur Erzielung einer Hemmwirkung ausreichten als in den Versuchen von Thorp, und deshalb gerade noch ein Unterschied zutage trat.

Die schlechtere Auswaschbarkeit der Wirkung der L-Isomeren spricht dafür, daß sie mit dem für ihre Wirkung spezifischen Teil des Moleküls an die empfindlichen Receptoren gebunden werden.

Summary

The paralysing potencies of the optical isomers of methadone and atropine were compared on the isolated guinea-pig ileum against contractions produced by acetylcholine, nicotine, histamine, and electrical impulses. The concentrations of the isomeres were determined which reduced the contractions to 50% (EC_{50}).

1. In low concentrations, the L-isomers of methadone and atropine were more potent than the D-isomers. This difference decreased with increasing EC_{50}.

2. No significant difference was found between the optical isomers of methadone with the high concentrations necessary to affect histamine contractions; however, L-methadone was 1,8 times more potent than D-methadone against acetylcholine contractions.

3. When the L-isomers were more potent than the D-isomers, their effect was less easily reversible.

The results suggest that the difference in potency between optical isomers allows no conclusion on their mechanim of action. Apparently

the difference depends on the sensitivity of the substrate on which they are compared, or in other words on the concentrations needed to produce an effect.

Literatur

Abdon, N. O.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **1**, 153 (1940). — Ambache, N.: Pharmacologic. Rev. **7**, 467 (1955). — Cushny, A. R.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **15**, 105 (1920). — Cushny, A. R.: Biological Relations of Optically Isomeric Substances. London: Baillière, Tindall & Co. 1926. — Kroneberg, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 522 (1955). — Minz, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **168**, 292 (1932). — Paton, W. D. M.: J. of Physiol. **127**, 40 P (1955a). — Paton, W. D. M.: J. of Physiol. **129**, 7 P (1955b) u. persönl. Mitteilg. — Riesser, O., u. S. M. Neuschlosz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **91**, 342 (1921). — Schaumann, O., M. Giovannini u. K. Jochum: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 460 (1952). — Schaumann, W.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 456 (1955). — Thorp, R. H.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 98 (1949).

Dr. W. Schaumann, Frankfurt/Main, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 52—66 (1956)

Aus dem Pathologischen Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. G. Holle)

Experimentelle Untersuchungen zur Morphologie toxisch wirkender Gaben von Methylthiouracil beim Meerschweinchen

Von
U. Hagemann

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Februar 1956)

In zahlreichen, vornehmlich klinischen Arbeiten wird auf die toxische Wirkung der Tyreostatica beim Menschen während chronischer Zufuhr des Medikamentes hingewiesen. Nach Himsworth kommen dabei prinzipiell zwei ursächlich verschiedene Möglichkeiten einer Schädigung in Betracht. Neben toxischen, durch Überdosierung bedingten Veränderungen treten dosisunabhängige Überempfindlichkeitsreaktionen auf. Bei der Durchsicht des Schrifttums ergibt sich, daß systematische experimentelle Untersuchungen zu dieser Frage bisher kaum durchgeführt worden sind. Deshalb wurde in einer eigenen Untersuchungsreihe am Meerschweinchen das pathologisch-anatomische Bild der Organveränderungen nach Zufuhr toxisch wirkender Gaben von Methylthiouracil (MTU) einer Prüfung unterzogen.

Bevor auf die eigenen Befunde eingegangen wird, erscheint es zweckmäßig, in einer gedrängten Übersicht die bisher bekannten Veränderungen an den einzelnen Organen zusammenzufassen.

Leber. Hüsing u. Loeser finden eine Glykogenose, die jedoch erst nach einer entsprechenden Latenzzeit evident wird. Eine mäßige Blutfülle der Leberacini sowie eine Vacuolisierung des Plasma mit zahlreichen Karyokinesen beobachteten Rachmilewitz, Rosin u. Doljanski. Kernteilungsfiguren traten dabei vornehmlich nach Beginn der Behandlung auf. Curtis u. Swenson beschreiben an einem großen Patientenmaterial neben leichteren passageren Hepatopathien auch schwere Formen von akuten gelben Leberatrophien. Mittels Leberfunktionsprüfungen findet Goodwin Abweichungen von den Normwerten, eine ernstliche Leberschädigung wird jedoch vermißt. Über Vergrößerung der Leber berichten Doetsch, Huf u. Auffarth sowie Leathem u. Seeley.

Hämopoetisches System. Im wesentlichen findet sich eine Abnahme der Leukocytenzahl im strömenden Blut (Astwood, Geissler, Hadorn u. Beer; Moore u. Mitarb., van Winkle, Hagen u. Schürmeyer; Schulze u. Francke; Lederer u. a.) sowie das Auftreten myeloischer Zelle (Fischer, Kopf u. Loeser) Agranulocytosen können sich entwickeln (Ferber u. Mitarb., Fishberg u. Vorzimmer; Kahn u. Stock; Seligman). Die Blutbildveränderungen werden allgemein auf

eine Markschädigung zurückgeführt. Nach Clark weist das Knochenmark eine etwa 16fach höhere MTU-Konzentration als das Blut auf. Neben toxischen Einflüssen werden allergisch-hyperergische Phänomene ursächlich diskutiert.

Gefäßsystem. Dalton, Morris u. Dubnik beschreiben hyaline Gefäßwanddegenerationen bei Mäusen.

Niere. Über den Befund einer verkalkenden Nephrose berichten Kopf, Loeser, Meyer u. Bieling sowie auch W. Müller. Die Möglichkeit einer bestehenden hypochlorämischen Nephrose wird in Betracht gezogen.

Haut und *Anhangsgebilde.* Haarausfall (Lederer) und Depigmentierungen werden beobachtet (Lynn, Thomas).

Material und Versuchsanordnung

Die Untersuchungen wurden an 9 männlichen und 5 weiblichen 5—8 Wochen alten, 210—350 g schweren Meerschweinchen (MS) durchgeführt. Behandlung mit 1,0—1,5 g MTU/kg Körpergewicht täglich (entsprechend 70—105 g MTU bei einem Menschen von 70 kg). Nach Hadorn u. Beer liegt die Dosis let. für Mäuse bei 0,75—1,0 g/kg, nach Bavin u. Goldschild für Ratten bei 1,5 g/kg.

Von unseren behandelten Versuchstieren gingen 4 innerhalb von 32 Std nach Versuchsbeginn zugrunde; 3 nach weiteren 18 Std. Am 3. und 4. Behandlungstag verstarben weiterhin 3 MS, am 5., 6., 7. und 21. Versuchstag wurde jeweils 1 MS obduziert.

Zur histologischen Bearbeitung wurden die Organe in 10% Formalin und in 96% Alkohol, das Pankreas in Zenker-Formol fixiert. Färbungen: Glykogendarstellung nach Best, Sudan III, Cholesterinnachweis nach Schultz, Nachweis der Doppelbrechung im polarisierten Licht, Hämalaun-Eosin, Goldnersche Trichromfärbung, van Gieson. Bei Bedarf Spezialfärbungen: Gomori, Azanfärbung, Silberfaserdarstellung, Methylgrün-Pyroninfärbung nach Brachet.

Darüber hinaus wurden die Kernvolumina der Nebennierenrinde nach dem Vorgehen von Boguth, Langendorff u. Tonutti bestimmt.

Untersuchungsergebnisse

1. Klinische Beobachtungen während der Versuchsdauer. Im Verlauf des Wirkungseintrittes des Medikamentes lassen sich verschiedene Phasen im Verhalten der Tiere feststellen. Relativ bald nach Versuchsbeginn macht sich eine mangelhafte Freßlust bemerkbar. Die Tiere sitzen mit gesträubtem Fell zusammengekauert in einer Ecke des Käfigs. Dabei fällt bald eine individuelle Toleranz der MS gegenüber dem Medikament auf. Während einzelne Tiere bereits einen kranken Eindruck machen, laufen andere noch munter im Käfig herum.

Im weiteren Verlauf nimmt die motorische Aktivität immer mehr ab, Spontanbewegungen sind nur selten zu beobachten. Die Tiere suchen sich kein Futter mehr; Reize verschiedener Art (akustische, sensible) werden kaum noch beantwortet. Vollkommen apathisch sitzen die MS im Käfig.

Bald treten Gleichgewichtsstörungen auf. Die Tiere fallen um, liegen auf der Seite und sind nicht mehr imstande, sich aufzurichten. Bringt man sie in die Rücken- oder Seitenlage, dann vermögen sie sich nicht mehr aufzurichten. Im Gegensatz zur Bewegungsarmut des vorherigen Stadiums beobachtet man jetzt unregelmäßige Bewegungen der Extremitäten, die große Ähnlichkeit mit Ruder- oder Pendelbewegungen aufweisen. Das Sensorium ist deutlich getrübt, Cornealreflexe sind nicht auszulösen. Vorübergehend können sich die MS erholen.

Über kurz oder lang treten jedoch klonisch-tonische Krämpfe der Extremitätenbeuger auf, die mit Unterbrechungen stundenlang anhalten können. Daneben werden Streckkrämpfe mit schwerem Opisthotonus beobachtet. In solchen Fällen

erfolgt dann meistens bald der Exitus durch Atemstillstand. Abwechselnd von diesem typischen Verhalten sieht man bei manchen Tieren im präterminalen Stadium nur rudimentär ausgebildete Krämpfe. Immer besteht aber auch hier eine schwere Trübung des Sensoriums.

2. Makroskopische Organveränderungen. Bei der Obduktion finden sich im allgemeinen wenig auffallende makroskpoische Organveränderungen. Neben einer mäßigen Blutüberfüllung der Leber und der Milz sieht man vorwiegend geringgradige Parenchymverfettungen. Die Nebennieren sind mehr oder weniger stark hyperämisch, gelegentlich lassen sich innerhalb der Rinde umschriebene Blutungen erkennen (Abb. 1). Die länger überlebenden Tiere sind außerordentlich stark abgemagert.

Abb. 1. Zwei Blutungsherde in der Nebennierenrinde

3. Mikroskopische Organveränderungen. Wesentlich mannigfaltiger sind die mikroskopischen Befunde, die zusammenfassend besprochen werden, da sie sich im wesentlichen nur quantitativ voneinander unterscheiden.

Leber. Das Organ zeigt im allgemeinen eine von der Versuchsdauer abhängige Verfettung mäßigen bis mittleren Grades: Bei zunehmender Überlebenszeit wird die Fettablagerung stärker. Eine Bevorzugung bestimmter Läppchenareale läßt sich nicht feststellen. Neben einer diffusen kommt auch eine unregelmäßig fleckförmige, in seltenen Fällen eine zentrale Verfettung vor. Dabei handelt es sich vorwiegend um Neutralfette; doppeltbrechende Lipoide sind nur spärlich nachzuweisen. Die Fetttröpfchen finden sich zuerst in den capillarnahen Anteilen des Cytoplasmas der Leberzellen, in späteren Stadien ist der ganze Zelleib angefüllt. Das Glykogen ist im Gegensatz zu unbehandelten Kontrolltieren geschwunden. Das Capillarsystem sowie die Zentralvenen sind stärker entfaltet. Einzelne Plasmavacuolen treten auf. Die Capillarmembran wird häufig durch einen schwach orangeroten Niederschlag (im Goldner-Präparat) von den Leberzellen abgehoben.

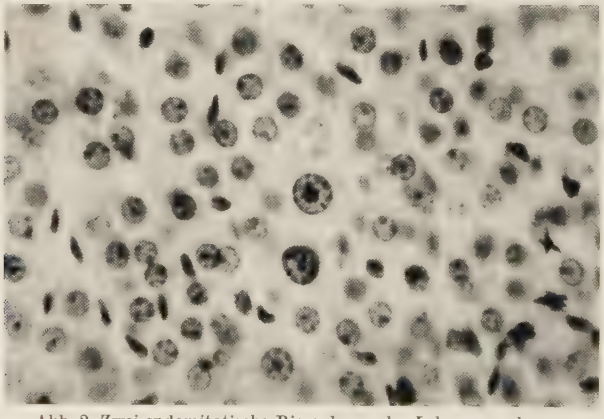


Abb. 2. Zwei endomitotische Riesenkerne des Leberparenchyms

Bei orientierenden Kernmessungen ergibt sich eine erhebliche Variationsbreite der Leberzellkerne mit mehr oder minder zahlreichen endomitotischen Riesenkernen (Abb. 2). Daneben kommen aber auch pyknotische oder karyolytische Kerne vor.

Die Nucleolen sind durchweg vergrößert und an Zahl vermehrt. Oft liegen sie der Kernwand an, die sie sogar etwas ins Plasma vorwölben können. Dabei ergeben sich bei der Methylgrün-Pyronin-Färbung ziemlich charakteristische Bilder. Um

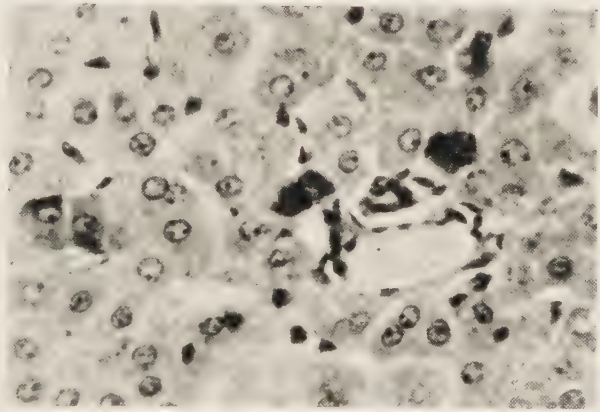


Abb. 3. Plasma einzelner Leberzellen mit pyroninpositiven Granula angefüllt

die Kerne herum sieht man häufig dichte rot angefärbte Ringe. Im Bereich der vorgewölbten Kernmembranen findet sich vermehrt pyroninpositive Substanz. Manchmal sind die Leberzellen von dichten roten Granula völlig angefüllt (Abb. 3). Aber

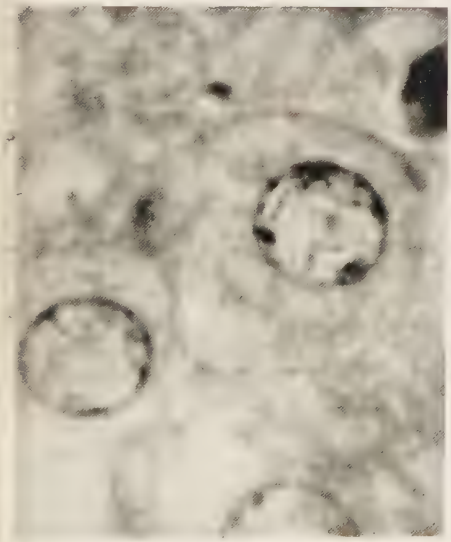


Abb. 4a. Leberzelle mit tafelartigen Kerneinschlüssen

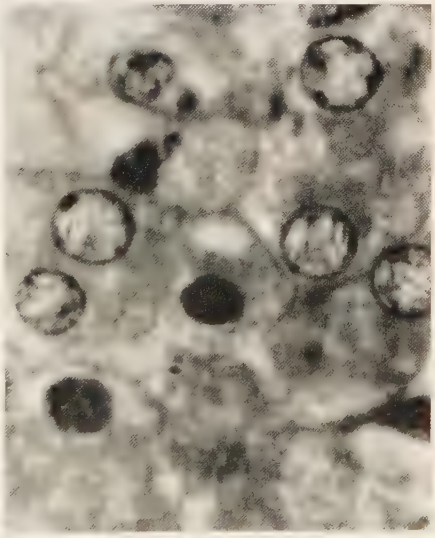


Abb. 4b. Kerninklusionen (oben) sowie diffus mit Pyronin rotgefärbte Kerne (im Bilde dunkel)

auch die Zellkerne können diffus rot tingiert sein; sie entsprechen im HE-Präparat meistens hyperchromatischen Kernen.

In den meisten Fällen wurden in den Leberzellen tafelartige, kristalloide Kern-Inklusionen beobachtet (Abb. 4), die bei Drehung des Schnittes um 360° im

Polarisationsmikroskop viermal Auslöschung und Aufhellung zeigen. Die Kanten dieser anisotropen Kristalle sind scharf abgesetzt und bilden vorzugsweise einen Winkel von 90°. Von mineralogischer Seite wurden sie dem monoklinen Typ zugeordnet. Interferenzphänomene konnten wegen der Kleinheit der Gebilde nicht beobachtet werden.

Nieren. Die Tubuli contorti I. Ordnung sowie weniger regelmäßig die Henleschen Schleifen sind staubförmig verfettet. Glykogenreaktion immer negativ. In zahlreichen Glomerula sieht man außerordentlich stark erweiterte und hyperämische Capillarschlingen, die gelegentlich kleinen Capillaraneurysmen ähneln. Die Tubulusepithelien sind trübe und geschwollen, die Erscheinungen halten sich jedoch

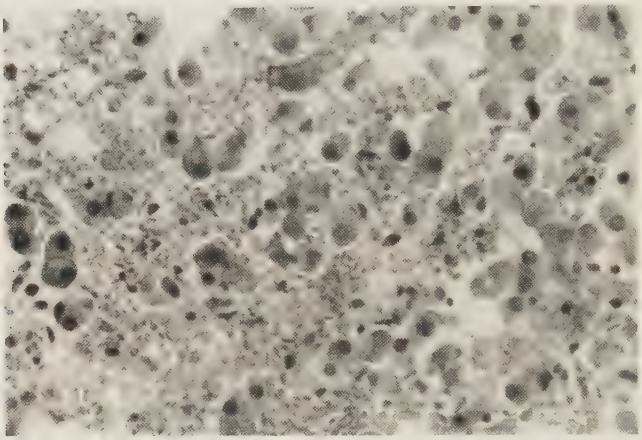


Abb. 5. Nebenniere: Rindenblutung mit Dissoziierung der Epithelstränge

insgesamt in mäßigen Grenzen. Epithelnekrosen fehlen, genau so wie Kalkablagerungen. Innerhalb der Kanälchenlichtungen finden sich Eiweißniederschläge, Cylinder werden aber nicht beobachtet.

Herzmuskel. Unregelmäßig ausgeprägtes interstitielles, vorwiegend herdförmiges Ödem mit spärlichen Eiweißniederschlägen. In ihrer Umgebung bestehen einzelne Myolysen. Bei längerer Überlebenszeit sieht man hier bereits eine celluläre Reaktion. Die Klappengrundsubstanz ist ödematös aufgelockert. Die Verfettung des Parenchyms ist insgesamt wenig ausgeprägt und zwar fleckförmig nach Art der Schilderhauszeichnung.

Milz. Neben einer deutlichen Blutfüllung der Flutkammern findet sich meistens eine mäßige reticuläre Hyperplasie. Aktivierungserscheinungen der Follikel fehlen.

Hirn. Es fallen vornehmlich Kreislaufveränderungen auf. So besteht eine deutliche Capillarhyperämie. Die Virchow-Robinschen Räume sind erweitert und enthalten gelegentlich schwach eosinrot gefärbte Niederschläge, hin und wieder auch Erythrocyten. Um die Gefäße herum sieht man häufig Ödemmäntel. Meistens ist auch das Rindengewebe sowie die paraventriculäre Hirnsubstanz ödematös.

Nebennieren. Die Rinde enthält außerordentlich wenig sudanophile Substanzen. In gleicher Weise ist auch der Gehalt an doppeltbrechenden Lipoiden vermindert. Der Lipoidschwund betrifft vornehmlich die Innenzone und den Mittelstreifen, in einzelnen Fällen auch die Außenzone der Fasciculata. Während bei kurzer Versuchsdauer der Fettgehalt herdförmig abnimmt, erstreckt er sich bei längerer Überlebensdauer auf die ganze Rinde.

An der Reticularis-Fasciculata-Grenze besteht meistens eine stärkere Hyperämie. Sie führt zu mehr oder weniger großen herdförmigen Blutungen mit Dissoziierung der Epithelstränge (Abb. 5). Stärke und Ausmaß der Blutungen nehmen bei längerer Versuchsdauer ab.

Die Chromierbarkeit des Nebennierenmarkes ist schwach ausgeprägt, ja sie fehlt bei den zuerst zugrunde gegangenen Tieren meist vollkommen. In den Markepithelien treten zahlreiche Vacuolen auf, die bei den besonders lange überlebenden Tieren wieder weitgehend verschwinden.

An den übrigen Organen wurden keine für unsere Untersuchungen wichtigen Befunde erhoben.

Besprechung der Untersuchungsergebnisse

Der klinische Verlauf der Versuche sowie die pathologisch-anatomische Auswertung der Organe zeigt eine variable individuelle Toleranz der MS. Die Hälfte der Tiere kam bereits nach zweitägiger Versuchsdauer ad exitum, während die übrigen MS zum Teil erst wesentlich später zugrunde gingen (maximale Überlebensdauer: 21 Tage). Die Toleranzbreite ist bei einer täglichen Gabe von 1,0 1,1 g MTU besonders deutlich ausgeprägt. Wird dagegen die Dosis auf 1,3 1,5 g/kg Körpergewicht erhöht, dann lebte kein MS länger als 45 Std.

Bei täglicher Gewichtskontrolle findet sich als konstantes Symptom eine Abnahme des Körpergewichtes. Auf diesen Befund weisen auch Huf u. Auffarth hin. Es besteht dabei keine Korrelation zwischen der Höhe des Gewichtsabfalles einerseits und der zugeführten Wirkstoffmenge andererseits. In einer Kontrollserie, bei der die Tiere zusätzlich mit der Schlundsonde Milch und Glucose erhielten, konnte ebenfalls ein beträchtlicher, wenn auch nicht ganz so ausgeprägter Gewichtsverlust beobachtet werden.

Die feingeweblichen Veränderungen an den Organen weisen auf einen verschiedenen Angriffspunkt des Pharmakons hin. Die Analyse ergibt Störungen des Kreislaufes, der Zellfunktion und der endokrinen Korrelation.

1. Kreislaufstörungen. Sie sind besonders ausgeprägt am Zentralnervensystem. Die Capillarhyperämie mit Austritt von Serum in die Virchow-Robinschen Räume steht am Anfang einer Entwicklung, die bei stärkerer Ausprägung in ein perivasculäres oder aber gelegentlich in ein diffuses Ödem der Hirnsubstanz besonders im Bereich der Hirnrinde und im paraventrikulären Gebiet übergehen kann. Bei der Suche nach kreislaufabhängigen, cellulären Veränderungen wurden morphologische Reaktionen in den verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen, die beim unbehandelten Kontrolltier fehlen.

Besonders sind diese Veränderungen an den Purkinjeschen Ganglienzellen der Kleinhirnrinde ausgeprägt. Unter gleichzeitiger Schrumpfung des Kernes und Fältelung seiner Membran werden die Zellen kleiner (Abb. 6). Der Nucleus wird dichter und enthält reichlich pyroninpositive

Substanzen. Die Nissl-Schollen des Plasmas werden gröber, fließen zusammen und schließlich wird der ganze Plasmaleib rot angefärbt. Im Endstadium resultiert daraus eine kleine, intensiv angefärbte

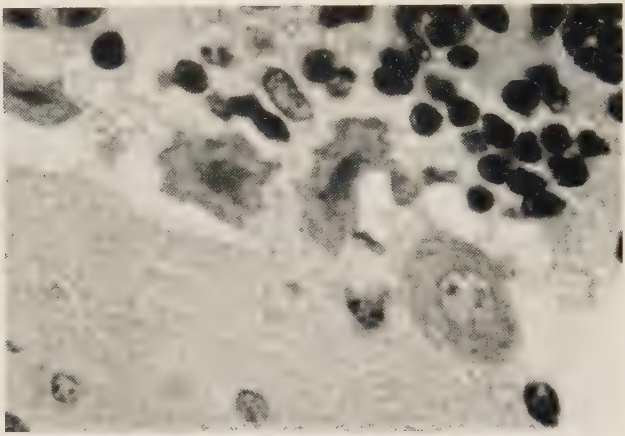


Abb. 6. Kleinhirn mit hypoxämisch geschädigten Purkinje-Zellen

Zelle, die keine Kernstrukturen mehr erkennen läßt. Reaktive phagocytäre Abbauerscheinungen wurden nicht beobachtet. Im allgemeinen finden sich diese Ganglienzellveränderungen hier und da an einzelnen Zellen, es kommen aber auch gruppenförmige Zelluntergänge vor.

Abb. 7. Großhirnrinde mit hypoxämisch geschädigten Ganglienzellen

Im Bereich der Hirnrinde sowie des Thalamus sind die Zellreaktionen im allgemeinen etwas schwerer erkennbar. Es handelt sich vorwiegend um gruppenförmige Zelluntergänge, die Dendriten sind in solchen Fällen meist korkzieherartig gewunden (Abb. 7).

Das Ausmaß der geschilderten Zellveränderungen steht in keiner Beziehung zur Versuchsdauer. Wohl aber lassen sich Parallelen zur Empfindlichkeit der einzelnen Grisea finden, die prinzipiell den bekannten Versuchsergebnissen von Sugar u. Gerard entsprechen. Wir möchten deshalb die gefundenen Zellveränderungen im Hirn als hypoxämische Schädigung der Ganglienzellen bei primäreren Kreislaufstörungen nach Einwirkung des MTU deuten. Grundsätzlich entsprechen die Veränderungen denjenigen Befunden, die bei den verschiedenartigsten Noxen am ZNS angreifen und ursächlich auf einen O_2-Mangel des Gewebes zurückzuführen sind (wie z. B. CO-Vergiftung, Blei-Intoxikation, chronischer Nährstoffmangel, Kollaps, epileptischer Krampfanfall usw.).

Kreislaufstörungen, wie sie im Hirn als morphologisches Substrat einer massiven MTU-Dosierung auftreten, lassen sich auch an anderen Organen nachweisen. Eine Plasmadiapedese findet sich im Herzmuskel den Hoden und in der Leber. Ihre funktionelle Bedeutung ist wohl nur gering einzuschätzen, zumal es sich um unerheblich ausgeprägte Veränderungen handelt. Die innerhalb des Herzmuskels gelegentlich auftretenden Myolysen dürften als unmittelbare Folge einer toxischen MTU-Wirkung anzusehen sein. Auch die capillarotoxische Schädigung der Nebennierenrinde mit mehr oder weniger ausgeprägten Hämorrhagien, auf die später noch eingegangen werden soll, gehört ebenfalls hierher. An den glomerulären Capillaren sind Capillarektasien sowie aneurysmatische Erweiterungen recht charakteristisch. Ihr Vorkommen dürfte eng mit der besonderen Ausscheidungsfunktion der Malpighischen Körperchen zusammenhängen, da hier der Kontakt mit den zu eliminierenden Stoffen (MTU bzw. seinen Abbauprodukten) außerordentlich eng ist. Eine gleichzeitige Beeinflussung der Tubulusresorption im Sinne eines nephrotischen Symptomenkomplexes bei bestehender Permeabilitätsstörung innerhalb der Glomerula läßt sich entgegen einigen Autoren nicht beobachten.

Als weitere Folgen des Capillarschadens mit konsekutiver Störung der Zelltätigkeit müssen wir die bestehenden Parenchymverfettungen ansehen, die im Herzmuskel weniger ausgeprägt sind, in den Nieren im wechselnden Ausmaß vorkommen und in der Leber praktisch immer vorhanden sind. Gerade die Leberverfettung zeigt deutlich ihren gefäßbedingten Charakter. Die ersten Fetttröpfchen treten vornehmlich im Capillarpol der Zelle auf, um sich später auch auf das übrige Plasma auszubreiten. Innerhalb der Läppchen besteht meistens eine periphere, gelegentlich auch zentrale bzw. diffuse Fettablagerung. Die insgesamt geringe Verfettung der Herzmuskulatur zeigt meistens einen fleckförmigen Charakter nach Art der Schilderhauszeichnung.

Bei den Tieren, die zwischen 28 und 50 Std nach Versuchsbeginn zugrunde gingen, ist die Fettablagerung besonders ausgeprägt. Diesseits

und jenseits dieser Grenze sieht man deutlich geringere Grade der Parenchymverfettung.

2. Unmittelbare Beeinflussung der Zelltätigkeit durch MTU. Die Zellveränderungen sind besonders an der Leber festzustellen und weisen sowohl einen progressiven, als auch regressiven Charakter auf. Nach Curtis u. Swenson erfolgt in der Leber eine erhebliche Anreicherung des Pharmakons. Sie dürfte bei unserer Versuchsanordnung besonders groß sein. Dabei erhebt sich die Frage, ob die Anflutung des Medikamentes mit einem vermehrten Stoffumsatz einhergeht (Entgiftung, Abbau). Auf Grund der mikroskopischen Untersuchungen möchten wir diese Frage bejahen. So finden wir strukturell Zellumwandlungen, die auf gesteigerte (progressive, anabiotische) Lebensvorgänge der Zelle hinweisen.

Neben einer Kern- und Plasmavergrößerung beobachtet man zahlreiche vergrößerte und gelegentlich vacuolisierte Kernkörperchen. Man sieht sie besonders ausgeprägt bei den länger überlebenden MS. Häufig liegen die vergrößerten Nucleolen der Kernmembran an und wölben den Kernrand ins Plasma vor. Gleichzeitig sammeln sich an dieser Stelle pyroninpositive Substanzen (also Ribonucleinsäuren) im Plasma an. Dichte rotgefärbte Ringe umgeben den Kern. Schließlich wird der gesamte Plasmaanteil von Ribonucleinsäure enthaltenden Schollen und Körnchen angefüllt. Offenbar finden unter der Einwirkung des MTU vermehrte Austauschvorgänge zwischen dem Nucleolus und dem Plasma statt, wobei es sich im wesentlichen um Ribonucleinsäuren handelt (Altmann). Ähnliche Zellveränderungen konnten in anderen Versuchsreihen bei niedrigerer Dosierung nicht beobachtet werden.

Bekanntlich vollziehen sich an den Cytoplasmapartikelchen, den Mitochondrien und Mikrosomen die wesentlichsten Stoffumsetzungen. Offenbar reicht der vorhandene Bestand an Mitochondrien unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht aus, um die angebotenen Mengen an MTU umzusetzen. Deshalb ist eine vermehrte Bereitstellung an Bildungsmaterial für die Plasmapartikelchen erforderlich. Das Substrat dieses Bildungsmaterials stellt die Ribonucleinsäure dar, die vom Nucleolus an das Cytoplasma abgegeben wird. Nach den Untersuchungen von Seifter, Muntwyler u. Harkiness sind etwa 60% des gesamten Ribonucleinsäurebestandes der Leberzellen an die Cytoplasmapartikel gebunden.

Für das Interrenalorgan der Selachier konnte Dittus den Nachweis erbringen, daß die Austauschvorgänge zwischen dem Kern und dem Cytoplasma einer hormonellen Steuerung unterliegen. So fand sich nach Zufuhr von corticotropem Hormon eine extreme Steigerung dieser Vorgänge. Nach Hypophysektomie blieben die Veränderungen aus. Nach Sandritter führen auch unspezifische Reize (z. B. Omnadin-Injektionen) zu dem gleichen Ergebnis. Möglicherweise handelt es sich dabei keineswegs nur um einen auf die Nebennierenrinde beschränkten Vorgang. Vielleicht werden die Austauschvorgänge in der Leber von dem gleichen Prinzip beherrscht. Wie später gezeigt wird, findet sich in den eigenen Versuchen offenbar eine corticotrope Stimulierung der Nebennierenrinde.

Weiterhin führt die Steigerung des Zellstoffwechsels auch zur Umbildung des gesamten Kernes, der sich zum Riesenkern vergrößeren

kann. Dabei handelt es sich offenbar um den Vorgang der von GEITLER aufgeklärten Endomitose. Innerhalb des Kernes kommt es zu einer Polyploidie ohne nachfolgende Protokaryonteilung. Es resultieren daraus Riesenkerne mit polyploiden Chromosomensätzen. In menschlichen Lebern kommen sie bei den verschiedenen Erkrankungen vor, stellen insgesamt eine unspezifische Antwort auf besondere Belastungen des Organs dar.

Weitere morphologische Veränderungen des Kernes im Sinne einer erhöhten Leistungsanforderung weisen darauf hin, daß unter Umständen eine Anpassung nicht möglich ist. In solchen Fällen wird der gesamte Nucleus zur Unterstützung des Nucleolapparates herangezogen; er färbt sich mit Pyronin diffus rot an, ein Zeichen dafür, daß er mit Ribonucleinsäure dicht angefüllt ist. Diese Kerne entsprechen im Hämalaun-Schnitt häufig kleinen hyperchromatischen Elementen. Wahrscheinlich haben diese Nuclei bereits ihre Leistungsgrenze überschritten, so daß sie als geschädigt und damit als regressiv anzusehen sind. Die Kernmembran ist häufig geknittert und gefältet. Im weiteren Verlauf kommt es zu anderen regressiven Veränderungen, die zu einer Zerbröckelung (Karyorhexis) oder zu einer Auflösung (Karyolyse) führen. Dabei ähneln die Bilder manchmal denjenigen verdämmernder Ganglienzellen.

Abgesehen von den bisher beschriebenen Zellveränderungen beobachteten wir in den Kernen der Leber kristalloide Einschlüsse, über die bereits an anderer Stelle berichtet wurde. Es könnte sich dabei um auskristallisiertes MTU handeln, das infolge Überschreitens der Löslichkeitsgrenze im Zellkern abgelagert wird. Weiter könnten sie bestimmten Reaktionsprodukten des MTU mit Kerneiweiß entsprechen. Schließlich kommen auskristallisierte Endprodukte des Kernstoffwechsels, etwa Harnsäure oder Allantoin in Frage. Die von uns beobachteten Einschlüsse sind jedenfalls nicht mit den bei Caniden häufig gefundenen Inklusionen identisch. Hier dürfte es sich um Eiweißcoacervate handeln. Morphologisch und färberisch bestehen eindeutige Unterschiede.

Die morphologischen Befunde an der Leber erlauben den Schluß, daß in diesem Organ das MTU zu bestimmten Enzymsystemen in Beziehung tritt, in deren Folge sich fördernde Stoffwechselvorgänge einstellen. Dabei wird die vermehrte Neubildung der Ribonucleinsäuren in den Vordergrund gerückt. Inwieweit darüber hinaus noch andere Fermentreaktionen induziert werden, entzieht sich unserer Kenntnis. In diesem Zusammenhang konnte BURKHARDT in unserem Institut bei einem Versuchstier anläßlich orientierender Vergleichsuntersuchungen am überlebenden Lebergewebe in der WARBURG-Apparatur eine gegenüber Kontrollebern erhöhte Atmung beobachten. Wir haben diesen Befund jedoch nicht systematisch weiterverfolgt.

Neben den fördernden Stoffumsetzungen ist auch mit inhibierenden Prozessen zu rechnen, wie sie von Holle u. Burkhardt für das Thiosemicarbazon angenommen wurden, zumal in den eigenen Versuchen ähnliche morphologische Kernveränderungen auftreten. Die chemische Ähnlichkeit der Uracile einerseits mit den Semicarbazonen und Sulfonamiden andererseits findet ihre Parallele im Hinblick auf ihr Verhalten im Stoffwechsel. Es ergibt sich nämlich an den Schilddrüsen der gleiche morphokinetische Effekt wie bei Anwendung der eigentlichen Thyreoinhibitoren (Huf u. Auffarth).

3. Veränderungen der endokrinen Korrelation. Im Vordergrund steht bei der akuten MTU-Belastung mit maximalen Dosen bei allen Tieren ein erheblicher Lipoidschwund der Nebennierenrinde, der sowohl bei der üblichen Fettfärbung als auch bei einer Untersuchung im polarisierten Licht nachweisbar ist. Auch der Schultzsche Test auf Cholesterin, dessen Spezifität als gesichert angesehen werden kann, zeigt eine hochgradige Abnahme dieser Substanz. Nur diejenigen MS, die innerhalb der ersten 28 Std nach Versuchsbeginn zugrunde gehen, lassen noch spärliche, meist fleckförmig angeordnete Bezirke von Cholesterin erkennen. Im allgemeinen finden wir den stärksten Lipoidschwund in dem Außenstreifen der Fasciculata.

Von besonderer Bedeutung sind die bei der mikroskopischen Untersuchung gefundenen Rindenblutungen, die sich vorwiegend an der Grenze der Reticularis und Fasciculata finden. Hämorrhagien werden sonst nur bei schweren akuten Infektionen oder Toxikosen beobachtet, wie z. B. bei der Diphtherie. Zwischen dem Ausmaß der Rindenblutungen und der Überlebensdauer der MS bestehen insofern Beziehungen, als sie besonders ausgeprägt (meist auch schon makroskopisch erkennbar) bei einer Überlebensdauer bis zu 50 Std vorkommen. Nach diesem Zeitpunkt haben wir sie in wesentlich geringerer Ausprägung gefunden. Innerhalb der Blutungsherde kommt es zur Dissoziation der Zellstränge und zu Epithelnekrosen; dabei sind die Rindenzellen praktisch lipoidfrei.

Beide Veränderungen (Lipoidschwund und Blutungen) sind als Zeichen einer intensiven Belastung des Organismus anzusehen und als solche grundsätzlich im Sinne eines unspezifischen MTU-Effektes zu deuten, wie sie auch von anderen Zuständen her bekannt sind (akute Blutverluste, Kollaps, Basedow-Krisen, Kohlenoxydvergiftung usw.). Erst die Betrachtung dieser verschiedenen Ursachen unter dem einheitlichen Gesichtspunkt einer akuten Belastung mit nachfolgender Sofortdekompensation erlaubt, das morphologische Substrat dem Symptomenkomplex einer Alarmreaktion (Stress) im Sinne von Selye unterzuordnen, wobei es in der NNR zu einer progressiven Transformation im Sinne Tonuttis kommt.

Dieser Befund ist recht bemerkenswert, da die meisten Autoren über eine Verschmälerung der NNR (regressive Transformation) berichten (Kracht u. Spaethe, Kloos u. a.). Der Rindenverbreiterung unter der Behandlung entspricht bei der histometrischen Analyse eine erhebliche Zunahme der Kernvolumina, die bei den männlichen Tieren im Höchstfall etwa $^1/_3$, bei den weiblichen MS sogar mehr als die Hälfte des ursprünglichen Summenkernvolumens beträgt (siehe Tabelle).

Es wurden jeweils 200 Zellkerne des Außenstreifens der Zona fasciculata gemessen. Bei 3 männlichen unbehandelten Kontrolltieren fand sich ein Summenkernvolumen von 39000 μ^3, bei weiblichen MS von 40000 μ^3. Das mittlere Kernvolumen betrug für die männlichen Tiere 193 μ^3, für die weiblichen 198 μ^3. Die mittlere Abweichung der Summenkernvolumina beträgt $\sigma_x = \pm 1{,}4\%$ bzw. $\pm 2{,}08\%$. Werte, die außerhalb der 3fachen Abweichung liegen ($\pm 4{,}2$ bzw. $\pm 6{,}5\%$), dürfen als echte Massenzunahme gewertet werden.

Vergleichen wir unter diesem Gesichtspunkt die gefundenen Zahlen bei den einzelnen Versuchstieren, dann können wir bis auf MS 353 und 364 eine reelle Zunahme der Summenkernvolumina feststellen. Auch die Methode des Differenzverfahrens nach Gotset u. Fisher ergibt eine statistische Sicherung der beobachteten Veränderungen ($t_{\text{Diff.}}$: ♀ 7,5; ♂ 15; Werte von mehr als 3 erfüllen die Forderung einer echten Differenz).

Die Zunahme der Kernvolumina macht sich tabellarisch in einer Rechtsverschiebung der Kerne innerhalb der angeführten Kernklassen bemerkbar. Wahrscheinlich erfolgt die Vergrößerung auch hier durch den Vorgang der Endomitose, die zu einer Verdoppelung des Volumens führt. Daneben finden sich auch Zwischenklassen, die um den Faktor $f = \sqrt{2}$ gegenüber der niederen Klasse größer sind. Hier handelt es sich um eine Verdoppelung der Oberfläche, wie es Hertwig seinerzeit nachgewiesen hat.

Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den bisher bekannten morphokinetischen Reaktionen der Nebenniere unter der Behandlung mit MTU, die gekennzeichnet sind durch eine Abnahme der Summenkernvolumina, eine Verschmälerung der Fasciculata sowie eine Zunahme des Lipoidgehaltes. Diese Standardreaktion wurde auch von uns bei geringerer MTU-Dosierung beobachtet. Modifikationen sind jedoch möglich, wie die vorliegenden Untersuchungsergebnisse verdeutlichen.

Darüber hinaus konnten wir dasselbe Verhalten auch beim trächtigen MS feststellen. Offenbar treten im Experiment die funktionellen Verknüpfungen, die der Erhaltung der Art dienen, mit den unter üblichen Bedingungen auftretenden Reaktionsabläufen in Konkurrenz, wobei erstere sich im allgemeinen durchzusetzen scheinen. Im Falle der Gravidität läßt sich die vorhandene endokrine-endogene Situation bei mittleren Dosen von MTU nicht aus dem Gleichgewicht bringen. Und bei den hier durchgeführten Versuchen stehen die funktionellen Umschaltungen der Alarmreaktion ganz im Vordergrund. In beiden Fällen wird der typische morphokinetische MTU-Effekt unterdrückt.

Die Tatsache, daß einzelne MS erst nach einer längeren Versuchsdauer trotz gleichbleibender hoher MTU-Gabe zugrunde gehen, legt den Gedanken nahe, daß diese Tiere im Verlauf einer mehr oder weniger langen

Tabelle 1. *Beziehungen zwischen Versuchsdauer, Fasciculata-Breite, Summenkernvolumina sowie deren Streuung gegenüber dem Mittelwert unbehandelter Kontrolltiere*

MS		Versuchsdauer Std	Breite der Fascic. μ	NNR-Kerne: Kernklasse/Anzahl Volumen μ^3							Summen-kernvolumen μ^3	Abweichung gegenüber dem Mittelwert unbeh. Kontrollen %
				77	121	185	233	356	475	616		
353	0	420	420	14	30	118	28	10			39700	1,8
350	0	28	510	2	2	110	48	32	4	2	46500	19,2
351	0	32	520		10	110	50	20			41500	6,4
349	0	45	660			94	56	34	10	6	51500	30,8
348	0	50	700	2	2	114	46	30	2	4	46300	18,7
363	0	72	750		10	80	70	40			46600	19,5
361	0	96	720	10	10	110	30	40			43600	11,5
362	0	120	640		10	114	38	32			43300	11,0
364	0	186	550	6	28	106	44	16			39400	1,0
345	0	30	530		4	62	98	26	6	4	49400	28,0
352	0	45	730			80	60	48	2	10	52600	31,5
347	0	80	750			34	52	86	16	12	64000	60,0
354	0	147	860			66	38	80	12	10	60300	50,8
346	0	528	820	2	8	84	48	52	—	6	49600	28,0

Resistenzphase in der Spätdekompensation ad finem kommen. Bei diesen Tieren findet sich wieder eine langsame Abnahme der NNR-Kernvolumina. Besonders trifft dies für die männlichen MS zu.

Die Schilddrüse beteiligt sich an dem Geschehensablauf nur unvollkommen. Selbst nach einer 22 Tage anhaltenden Behandlungsdauer finden sich nur unerheblich ausgebildete Veränderungen, die keineswegs dem Ausmaß der sonst zu diesem Zeitpunkt üblichen Reaktion bei mittlerer Dosierung entsprechen. In diesem Verhalten sehen wir eine Bestätigung der bisher bekannten Anschauungen über die Sekretionsbiologie der Hypophyse. Ihre intensiv gesteigerte corticotrope Partialfunktion läßt eine gleichzeitige wesentliche Stimulierung der Schilddrüse, selbst bei langer Behandlungsdauer, nicht zu. Zusammenfassend ergibt sich bei hoher Dosierung eine deutliche Dysregulation, die vom typischen morphokinetischen MTU-Effekt abweicht. Die Schilddrüse spricht auf die antithyreoidalen Substanzen kaum an, während an den NN-Zeichen einer progressiven Rindentransformation festzustellen sind.

Zusammenfassung

Es wird das morphologische Substrat der toxischen MTU-Wirkung am Meerschweinchen beschrieben. Während der makroskopische Organbefund bei der Sektion wenig eindrucksvoll ist, zeigt die histologische Untersuchung eine Reihe von Veränderungen, die als Folge verschiedener Angriffspunkte des MTU zu deuten sind.

1. *Kreislaufstörungen* sind besonders ausgeprägt im Bereich der terminalen Strombahn des ZNS. Sie bestehen in einer peristatischen Hyperämie, Serum- und Erythrodiapedese sowie perivasculären Ödemmänteln. Anoxämische Zellveränderungen wurden an den Ganglienzellen der Klein- und Großhirnrinde sowie im Thalamus gefunden. Auch im Herzmuskel, Hoden und in der Leber läßt sich die Serumdiapedese nachweisen. Blutungen in der Nebennierenrinde, aneurysmatische Capillarectasien innerhalb der Nierenkörperchen sowie anoxämische Parenchymverfettungen der Leber und des Herzmuskels vervollständigen das Bild der Kreislaufstörung.

2. An den *Leberzellkernen* werden progressive und regressive Veränderungen beschrieben. Als Zeichen eines gesteigerten Kernstoffwechsels nehmen die Nucleolen an Zahl und Größe zu, die Austauschvorgänge zwischen Kerneiweiß und Plasma werden lebhafter. Gleichzeitig treten endomitotische Riesenkerne auf. Kernpyknosen und Karyolysen werden als regressive Merkmale gedeutet.

3. Am Beispiel des Verhaltens der Nebenniere und der Schilddrüse läßt sich eine *hormonelle Dysregulation* nachweisen. Entgegen der

typischen Standardreaktion kommt es nach hoher MTU-Zufuhr zu einer Verbreiterung der Nebennierenrinden, Zunahme ihrer Kernvolumina und zum erheblichen Lipoidschwund.

Literatur

Altmann, H. W.: Z. Naturforsch. 4b, 138 (1949). — Z. Krebsforsch. **58**, 632 (1952). — Altmann, H. W., u. H. Schubothe: Beitr. path. Anat. **107**, 3 (1942). — Altmann, H. W., u. R. Meny: Naturwissenschaften **39**, 138 (1942). — Astwood, E. B.: J. Amer. Med. Assoc. **122**, 78 (1943). — Bavin, E., and D. A. Goldschild: Nature (Lond.) **157**, 659 (1946). — Boguth, W., H. Langendorff u. E. Tonutti: Med. Welt **1951**, 408. — Clarke, W. E.: Brit. Med. J. **1948**, 597. — Curtis, G. M., and R. E. Swenson: Surg. etc. **86**, Suppl. Bd., 105 (1948). — Dalton, A. J., H. P. Morris and C. S. Dubnik: J. Nat. Canc. Inst. (Bethesda) **9**, 201 (1948). — Dittus, P.: Z. wiss. Zool. A. **154**, 40 (1941). — Doetsch, H.: Dtsch. med. Rdsch. **1949**, 697. — Ferber, J., D. M. Spainand and R. T. Catheart: J. Amer. Med. Assoc. **127**, 646 (1935). — Fischer, L., R. Kopf u. A. Loeser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 730 (1948). — Fishberg, E. H., and J. Vorzimmer: J. Amer. Med. Assoc. **128**, 915 (1945). — Geissler, J. A.: Blood **1**, 407 (1946). — Geitler, L.: Erg. Biol. **18**, 1 (1941). — Goodwin, J. F.: Brit. Med. J. **1948**, 64. — Hadorn, W., u. K. Beer: Dtsch. med. Wschr. **1947**, 1. — Hagemann, U.: Hab.-Schrift Greifswald 1954/55. — Verh. dtsch. Ges. Path., 39. Tagg. Zürich. — Hagen, J., u. A. Schürmeyer: Med. Klin. **1947**, 847. — Hertwig, G.: Anat. Anz. Erg. H. **87**, 65 (1938/39). — Himsworth, H. P.: New England J. Med. **229**, 97 (1943); **230**, 13 (1944). — Holle, G., u. R. Burkhardt: Virchows Arch. **325**, 26 (1954). — Huf, E., u. F. Auffarth: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 394 (1949). — Hüsing, E., u. A. Loeser: Klin. Wschr. **1949**, 349. — Kahn, J., and R. P. Stock: J. Amer. Med. Assoc. **126**, 358 (1944). — Kloos, K.: in: Probleme des mypophysen-Nebennierenrindensystems. Berlin: Springer 1953. — Kopf, R., A. Loeser, G. Meyer u. H. J. Bieling: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 256 (1949). — Kracht, J., u. M. Spaethe: Virchows Arch. **323**, 174 (1953); **324**, 83 (1953). — Leathem, J. H., and R. D. Seeley: Endocrinology (Springfield, Ill.) **42**, 150 (1948). — Lederer, J.: Ann. d'Endocrin. **10**, 44 (1949). — Lynn, W. G.: Anat. Rec. **99**, 662 (1947). — Moore, F. D.: J. Amer. Med. Assoc. **130**, 152 (1944). — Müller, W.: Zbl. Path. **85**, 24 (1949). — Sandritter, W., u. F. Hübotter: Frankf. Z. Path. **65**, 219 (1954). — Rachmilewitz, M., A. Rosin and L. Doljanski: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **66**, 153 (1947). — Schulze, E., u. R. Franke: Dtsch. Arch. klin. Med. **194**, 369 (1949). — Seifter, S., E. Muntwyler and D. M. Harkiness: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **75**, 46 (1950). — Seligman, B.: J. Amer. Med. Assoc. **129**, 1123 (1945). — Selye, H.: Testbook of Endocrinology, 2. ed., Montreal 1949/50. — Gosset, W. S. u. R. A. Fisher: zit. bei E. Weber: Grundriß der biologischen Statistik. Jena 1948. — Thomas, A.: Anat. Rec. **99**, 663 (1947). — Tonutti, E.: Endocrinologie (Springfield, Ill.) **28**, 15 (1952). — van Winkle, W. jr., St. M. Hardy, G. R. Hazel, D. C. Hines, H. S. Newcomer, E. A. Sharb and W. N. Sisk: J. Amer. Med. Assoc. **130**, 343 (1946).

Doz. Dr. med. U. Hagemann, Greifswald, Pathologisches Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 67—74 (1956)

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen (Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Weinig)

Vorkommen und Ausscheidung von α-Äthyl-α-Oxybuttersäure nach Adalinaufnahme*,**

Von

Georg Schmidt

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. März 1956)

Von den Schlafmitteln der Harnstoffreihe ist Adalin seit mehr als vierzig Jahren das bekannteste. Auch unter anderen Schutzbezeichnungen wird Bromdiäthylacetylcarbamid verwendet, z. B. als Adormin, Carbromal, Dibroluur, Nyctal, Somben, Tildin. Der Mißbrauch von Adalin, der durch die gegenüber den Barbituraten gelockerte Rezeptpflicht gefördert wird, führt zwar selten zu tödlichen Vergiftungen, da erst 10—30 g (= 20—60 Tabletten) als tödliche Dosis bei Erwachsenen zu betrachten sind (Moeschlin); in der Kombination mit Barbituraten (z. B. im Sekundal, Tempidorm) ist es aber häufiger bei tödlichen Vergiftungsfällen zu finden. Weitere Kombinationspräparate sind Temagin und Doroma (neu).

Bis jetzt gab es keine Möglichkeit, den Beweis einer Adalinaufnahme durch Untersuchung des Harns zu führen. Das Adalinmolekül wird in bisher unbekannter Weise im Körper abgebaut. Lediglich die Untersuchung des ausgeheberten oder bei der Sektion gesicherten Mageninhalts, weniger die des Duodenalinhalts, gestattete unter Umständen die Isolierung und Identifizierung von unverändertem Adalin, das in Säuren schlecht, in Alkalien gut löslich ist. Die Resorption wird deshalb auch erst im Dünndarm angenommen.

* Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür ihr auch an dieser Stelle besonderer Dank ausgesprochen wird.

** Auszugsweise auf der Jahresvslg. d. Dtsch. Ges. f. gerichtl. u. soziale Med. in Düsseldorf am 26. 7. 1955 vorgetragen.

Im Reagensglasversuch erhielten Rosenmund u. Herrmann beim Kochen von Bromdiäthylacetylcarbamid mit verdünnter Natronlauge folgende Produkte:

Alkalibromid,
Alkalicyanid,
Ammoniak,
Diäthylhydantoin,
Äthylcrotonylharnstoff,
ein hochsiedendes Öl,
einen hochschmelzenden alkalilöslichen Körper.

Dagegen fand nach Körperpassage von Adalin Filipi eine „Halogen-Fettsäure" im Harn, die bei 87—89° C schmolz und die er für Bromdiäthylessigsäure hielt. Andere Untersucher konnten diesen Befund nicht bestätigen. Rosenmund hielt die Auffassung von Filipi für irrig, da die Brom diäthylessigsäure einen Schmelzpunkt von 20° C hat.

Mit der Untersuchung des Harnes nach Adalinaufnahme beschäftigten sich vor allem Schäfer, Impens, Takeda, Wojahn u. Edler. Sie fanden anorganisches Bromid im Harn und nur in Spuren organisch gebundenes Brom in ätherlöslicher Verbindung. Edler glaubte auch Spuren einer Substanz erkannt zu haben, in der er unverändertes Adalin vermutete. Der Nachweis von anorganisch und organisch gebundenem Brom nebeneinander gab deshalb bisher bei der Untersuchung des Harnes den einzigen Hinweis auf eine erfolgte Aufnahme von Bromdiäthylacetylcarbamid. In Ausscheidungsversuchen am Menschen wurde von Impens u. Edler festgestellt, daß organisch gebundenes Brom nur in einem sehr geringen Prozentsatz und nur bis kurze Zeit (5 Tage) nach Beendigung der Adalinaufnahme im Harn erscheint. Anorganisches Brom soll dagegen noch 4 Wochen lang nach Beendigung einer 7tägigen Adalinaufnahme von insgesamt 7 g ausgeschieden worden sein und sollte (Edler) 86,74% des aufgenommenen Broms erreicht haben!

Von normalem Bromvorkommen im Harn wird von den genannten Autoren nichts erwähnt, obwohl Abelin u. Poretti für normales Serum einen Bromgehalt zwischen 500 und 1000 γ% angeben.

Der Nachweis von Brom aus biologischem Material ist schwierig zu führen. Mantel hat in seiner Dissertation die am meisten gebräuchlichen Bromnachweis- und -bestimmungsmethoden referiert und festgestellt, daß die Fehlerbreite mit fallenden Brommengen stark ansteigt. Dies deckt sich mit unseren eigenen Erfahrungen, die mit der von Edler modifizierten Methode nach Berglund-Toxopéus gewonnen wurden. Ist Brom nur in Bruchteilen von Milligrammengen im Untersuchungsmaterial vorhanden, so wird die quantitative Bestimmung sehr ungenau, da beim Aufschluß unkontrollierbare Mengen verlorengehen.

Für den forensisch-toxikologischen Nachweis von Adalin ist mit dem Auffinden von Brom in Harn nicht viel gewonnen, da erstens die Bromausscheidung auch nach einmaliger Aufnahme viele Tage anhält, zweitens so viele bromhaltige Arzeimittel im Handel sind, daß eine Zuordnung unmöglich ist und drittens mit physiologischen Brommengen zu rechnen ist.

Da die Frage einer Adalinaufnahme in der forensisch-toxikologischen Praxis immer wieder an uns herangetreten ist, haben wir unter Mitwirkung von Walz, Deisel u. Burgdorf ausgedehnte Harnuntersuchungen nach therapeutischer Adalinaufnahme durchgeführt. Sie erbrachten zunächst das unerwartete Ergebnis, daß nach Einnahme von Adalin im Harn deutlich vermehrt Benzoesäure zu finden war. Auffallend war besonders, daß nach erstmaliger Adalinverabreichung oder

bei erneuter Aufnahme nach längerer Pause von mehreren Wochen immer ein vermehrtes Vorkommen der Benzoesäure im Harn des folgenden Tages festzustellen war.

Der Anstieg der Benzoesäureausscheidung im Harn kann für einen Hinweis auf Adalinaufnahme nicht herangezogen werden, denn Benzoesäure kommt im Harn an sich in stark wechselnden Mengen vor. Außerdem haben wir bei anderen Versuchen nach erstmaliger Aufnahme von Persedon, Cliradon, Barbituraten und verschiedenen Pyrazolonderivaten ebenfalls Benzoesäurevermehrung festgestellt.

Hippursäure, die bekanntlich nach der Aufnahme verschiedener Arzneimittel vermehrt im Harn gefunden wurde, kam bei unseren Versuchen in stark wechselnden Mengen vor.

Nachdem wir zahlreiche Harnuntersuchungen mit verschiedener Extraktionstechnik durchgeführt hatten, fanden wir mit Deisel nach mehrtägiger Adalinaufnahme *erstmals eine zunächst unbekannte kristallisierbare Substanz im Vakuumsublimat*, die bisher noch nie in unseren „Leerharn"-Extrakten beobachtet worden war. Die Versuchsperson hatte bei dieser Versuchsreihe 4 Tage lang je 1 g und am 5. Tag 2 g Adalin jeweils abends eingenommen. Die Medikation wurde zunächst gut vertragen, lediglich am 5. Tage stellte sich eine gewisse Benommenheit nach etwas verlängertem Nachtschlaf ein, die aber die Arbeitsfähigkeit nur mäßig beeinträchtigte. Von dem gesammelten Tagesharn wurde jeweils eine Menge von 500—600 ml nach Ansäuerung mit Salzsäure mittels Äther erschöpfend extrahiert und der getrocknete Äther durch Warmluft verjagt. Die Rückstände wurden mit geglühtem Natriumsulfat vermengt und im Vakuum (16 mm Hg) sublimiert. Für diese Versuche wurde anfänglich ein einfacher Aluminiumheizblock mit Bohrloch verwendet, in das ein Reagensglas eintauchte. Das obere Drittel des Reagensglases wurde mit einer Wasserschlange gekühlt.

Bei dieser Methodik wurde in den Harnextrakten der einzelnen Tage in zunehmender Menge eine weiße, kristalline Substanz isoliert, die nach der Resublimation einen Schmelzpunkt von 76—77° C aufwies. Die Substanz war in Äther, Wasser und Alkohol gut löslich, war halogen- und stickstofffrei und hatte Säurecharakter. Beim Glühen hinterließ sie keinen Rückstand. Im Extrakt des zuletzt untersuchten Harnes vom 6. Tag war sie in einer Menge von etwa 10 mg enthalten.

Einmal aufmerksam geworden, fanden wir diese Substanz in zahlreichen Harnextrakten nach Adalinaufnahme wieder, und zwar auch schon *nach einmaliger Aufnahme von 2—4 Tabletten*. Insgesamt wurden jeweils zahlreiche Harnportionen von 4 männlichen und 4 weiblichen erwachsenen Versuchspersonen während mehrtägiger Adalinaufnahme untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die gleichzeitig ausgeschiedene Benzoesäuremenge in frischen Harnen um so kleiner war, je mehr von der

unbekannten Substanz in den Sublimaten zu finden war. Diese Substanz ließ sich bereits vor der chemischen Identifizierung durch die Bestimmung kristalloptischer Konstanten gut nachweisen.

Da bei der Vakuumsublimation mit Hilfe des Aluminiumblockes Benzoesäure und die unbekannte Substanz sich oft störend überlagerten, verwendeten wir bald eine andere Apparatur, die von M. Behrens entwickelt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden war. Dieses Gerät hat sich uns auch bei vielen anderen Substanztrennungen gut bewährt. Es besteht aus einer waagrecht gelagerten Glashülse, in die das Sublimationsrohr (4—5 mm Durchmesser, 600 mm Länge) eingeschoben wird. Die Glashülse wird durch Umwicklung mit Heizdraht so erwärmt, daß ein kontinuierlicher Temperaturabfall von einem zum anderen Ende entsteht. In diesem Wärmegradienten verteilen sich die sublimierenden Substanzen je nach ihrer druckabhängigen Verdampfungstemperatur, so daß eine Trennung zu erzielen ist. Sie schlagen sich im Innern der Glasröhre in Zonen nieder und werden nach Zerschneiden des Glasrohres herausgelöst. Zur Vermeidung dieses Arbeitsganges statteten wir das Gerät mit einer in das Sublimationsrohr eingezogenen hitzebeständigen Kunststoff-Folie aus. Die Firma Kalle & Co. stellte uns ihre „Hostaphanfolie" zur Verfügung, deren Erweichungstemperatur bei 150° C liegt. Die Folie eignet sich für Vakuumsublimationen bis 200° C und verklebt auch nach Erweichung nicht mit dem Rohr. Sie gestattet nach beendigter Sublimation das trockene Entfernen der Sublimatfraktionen aus dem Rohr unter Erhaltung der im Vakuum erzielten, besonders schönen Kristalle für eine optische Identifizierung. Das Vakuum von 10^{-1}—10^{-2} Torr wird durch eine zweistufige Ölpumpe erzeugt. Die meisten Sublimationen nehmen in diesem Gerät 5—20 min in Anspruch. Das Untersuchungsmaterial wird in einem Arbeitsgang praktisch quantitativ fraktioniert sublimiert.

Nachdem die von uns gefundene unbekannte Substanz nur in Harnen auftrat, die nach Adalinaufnahme gewonnen worden waren, erschien die Konstitutionsaufklärung wünschenswert. Da die Substanz gut wasserlöslich war, wurde sie zur Beseitigung der Verunreinigung durch Benzoesäure in wenig Wasser gelöst und erneut mit Äther extrahiert. Nach dem Trocknen des Äthers mit Natriumsulfat und nach dem Eindampfen wurde der Rückstand wiederholt im Vakuum umsublimiert. Wegen der geringen Substanzmenge von etwa 20 mg, die nach der Reinigung übrig blieb, wurde zunächst versucht, durch Messung der Infrarotabsorption einen Einblick in die Struktur zu bekommen. Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Oswald durchgeführt. Im Infrarotspektrometer Modell 112 von Perkin-Elmer wurde die als Schmelztropfen zwischen zwei erhitzte Steinsalzplättchen gebrachte Substanz im Bereich zwischen 1 und 15 μ spektrographiert (siehe Abb. 1a). Das Absorptionsspektrum ließ erkennen, daß es sich um eine kurzgliedrige Fettsäure handelte.

Der Rest der Substanz wurde elementaranalytisch untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

C	52,95%
H	9,35%
O	36,74%
	99,04%

Dieses Ergebnis sprach für eine Verbindung mit der Summenformel $C_6H_{12}O_3$, die folgende prozentuale Zusammensetzung hat:

C 54,47%
H 9,16%
O 36,38%
100,01%

Auf Grund der Konstitution des Adalinmoleküls war theoretisch als brom- und stickstofffreies Abbauprodukt die α-Äthyl-α-Oxybuttersäure

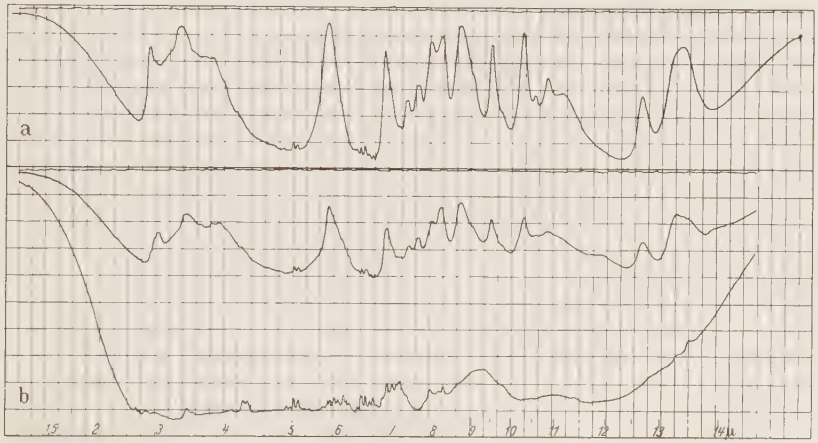
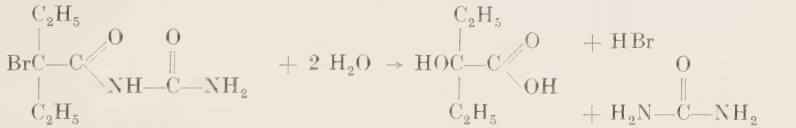


Abb. 1. Infrarot-Spektren von α-Äthyl-α-Oxybuttersäure, aufgenommen Infrarotspektrometer Modell 112 von PERKIN-ELMER. a) aus Harn nach Adalinaufnahme, b) synthetisierte Substanz

zu erwarten, die die berechnete Summenformel $C_6H_{12}O_3$ und einen Schmelzpunkt von 80° C hat.



Bromdiäthylacetylcarbamid α-Äthyl-α-Oxybuttersäure $C_6H_{12}O_3$

Da diese Substanz im Handel nicht erhältlich ist, führten wir die Synthese durch und wählten auf Anregung von WEINIG den analogen Weg, wie ihn R. MEYER zur Darstellung der α-Oxyisobuttersäure aus Isobuttersäure eingeschlagen hat, indem wir von Diäthylessigsäure ausgingen (α-Äthylbuttersäure). Hierbei wird in stark natronalkalischer Lösung die Diäthylessigsäure mit Kaliumpermanganat oxydiert. α-Äthyl-α-Oxybuttersäure wird dann als Zinksalz ausgefällt und nach Ansäuern mit Äther extrahiert. Die Kristallisation des Rückstandes nach Trocknen und Abdampfen des Äthers erfolgt erst nach Tagen, wird aber durch Vakuumsublimation rasch erreicht.

Die synthetisierte α-Äthyl-α-Oxybuttersäure hatte einen Schmelzpunkt von 80° C, der Schmelzpunkt der Gemische mit unserer aus Harnextrakten isolierten Säure lag ohne nennenswerte Depression bei 78° C. Die infrarotspektrographische Untersuchung ergab das gleiche Absorptionsspektrum (Abb. 1b) und die festgestellten kristalloptischen Daten stimmten mit denen unserer Säure gut überein.

Damit war bewiesen, daß es sich bei der von uns gefundenen Säure tatsächlich um α-Äthyl-α-Oxybuttersäure handelte, und der Schluß war gerechtfertigt, daß diese Säure in den Harnextrakten aus dem Abbau des Adalinmoleküls stammte.

Bei dieser Substanz handelt es sich um die *Diäthoxalsäure* der älteren Literatur, die im menschlichen Körper unseres Wissens bisher nicht beobachtet worden ist. Frankland erhielt die Säure als erster 1867 durch Verseifen des Diäthoxalsäurediäthylesters. Auf Veranlassung von Erlenmeyer wurden von Silber 1877 eingehendere Untersuchungen über die Diäthoxalsäure und ihre Abkömmlinge durchgeführt. Haushofer führte im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Silber 1877 die kristallographische Untersuchung der Diäthoxalsäure und einiger Salze durch. Er stellte fest, daß die freie Säure in Form trikliner, pinakoidaler Blättchen auskristallisierte und folgende Daten aufwies:

$a : b : c = 0{,}2654 : 1 : ?$
$\alpha = 68°54'$; $\beta = 114°17'$; $\beta = 107°38'$.
beobachtete Formen: b {010}; a {100}; c {001}; selten p {110}.
$a : b = 79°30'$. $a : c = 70°08'$. $b : c = 105°43'$. $p : b = 65°49'$. (Haushofer).

Während bei der chemischen Umwandlung des Bromdiäthylacetylcarbamids (Adalin) Diäthoxalsäure bisher nicht beobachtet wurde, haben Mannich u. Zernik 1908 bei der Untersuchung des Bromdiäthylacetamids (Neuronal, ein Vorläufer des Adalins) zu einem geringen Prozentsatz u. a. Diäthoxalsäureamid erhalten, wenn sie Neuronal mit 10%iger, wäßriger Natronlauge gekocht hatten.

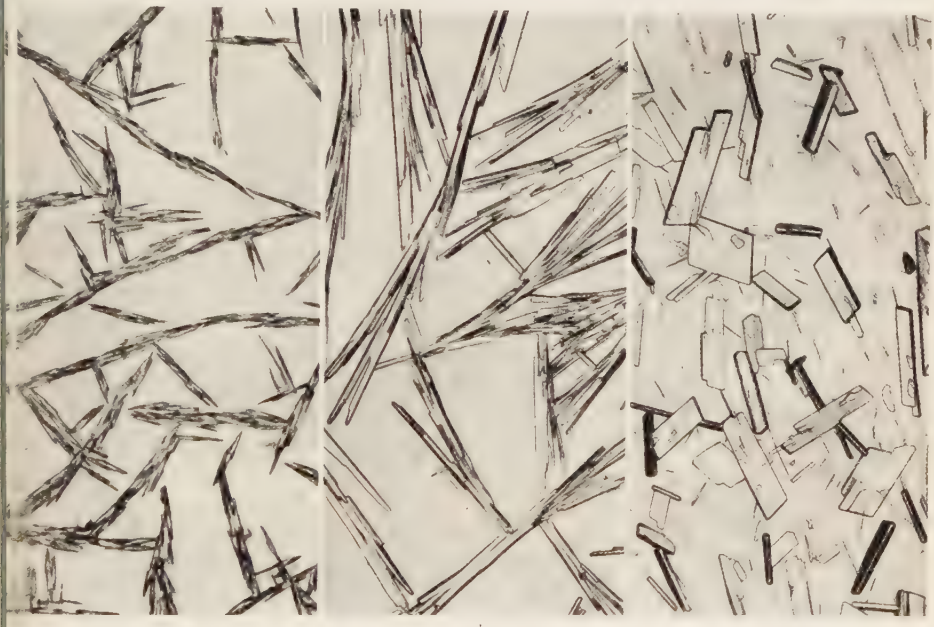
In zahlreichen weiteren Versuchen haben wir festgestellt, daß bei verschiedenen Personen α-Äthyl-α-Oxybuttersäure im Harn in faßbarer Menge dann auftrat, wenn Nebenwirkungen (meistens leichte Benommenheit) nach Adalinmedikation angegeben wurden.

Bei zwei Vergiftungsfällen mit angeblich 10 bzw. 20 Tabletten Adalin fanden wir noch 2 und 3 Tage nach der Giftaufnahme die erwähnte Säure im Harn. Die Vergiftungen hatten jeweils zu einer mehrstündigen Bewußtlosigkeit geführt.

Für die Identifizierung der α-Äthyl-α-Oxybuttersäure eignet sich neben der Schmelzpunktsbestimmung am besten die kristalloptische Untersuchung der Sublimate[1]. Wir konnten zwei Modifikationen nachweisen: Beim Sublimieren auf dem Mikroheiztisch nach Kofler tritt zunächst eine instabile Modifikation (Abb. 2a) auf, die aus kleinen, parallel verwachsenen Nadeln besteht und in nahezu rechtem Winkel Aussprossungen

[1] Die kristalloptischen Untersuchungen wurden mit einem von der deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellten Standard-Polarisationsmikroskop der Firma Winkel-Zeiss-Göttingen durchgeführt.

aufweist. Die Doppelbrechung ist sehr schwach. In größerer Dichte sublimiert, ergaben sich nach einiger Zeit pinselartig verzweigte, flache Stengel (Abb. 2b), die zur gleichen Modifikation zu rechnen sind. Erst nach einigen Stunden wandeln sich diese Kristallformen in die stabile Modifikation um, die HAUSHOFER beschrieben hat (Abb. 2c). Diese besteht aus schmalen, langen Parallelogrammplättchen mit einem Winkel von 72°. Auch hier ist die Doppelbrechung schwach. Die Auslöschung



a *b* *c*

Abb. 2. *a—c.* α-Äthyl-α-Oxybuttersäure. Fp 80°. a) Frisches Sublimat, instabile Modifikation. 400 : 1. b) Nach längerer Sublimationsdauer; Übergang von der instabilen zur stabilen Modifikation. 200 : 1. c) Das gleiche Sublimat einige Stunden nach der Sublimation, stabile Modifikation. 200 : 1

erfolgt fast parallel zu den Längskanten mit einer Schiefe von 3°. Die Kristalle sind optisch zweiachsig und besitzen einen kräftigen Dichroismus. Für die Bestimmung der Brechungsindices eignet sich am besten Paraffinöl, das mit 1,4691 gerade zwischen $n\alpha'$ und $n\gamma'$ liegt.

Bei fraglichen Vergiftungsfällen dürfte die Extraktion von 50 ml Harn genügen, um eine Adalinaufnahme nachzuweisen, die die therapeutische Dosis überschritten hat. *Unverändertes Adalin konnten wir im Harn noch niemals nachweisen.* Es scheint, daß das Molekül bei der Körperpassage quantitativ abgebaut wird. Auf welchem Wege der Abbau erfolgt, ist noch nicht geklärt. In Betracht kommt die hydrolytische Abspaltung des Harnstoffs nach Substitution des Broms am tertiären C-Atom durch eine Hydroxylgruppe.

Bis jetzt gelang es uns nicht, ein weiteres Abbauprodukt zu fassen. Bemerkt sei noch, daß wir in Wasserdampfdestillaten von Adalinharnen stets eine schwach positive Reaktion nach Averell u. Norris fanden, die mit und ohne Reduktion der Probe auftrat, wie sie sonst bei aromatischen Aminokörpern beobachtet wird. Bei der Untersuchung der alkalisierten Harne nach der Widmark-Methode traten Werte bis 0,2‰ (berechnet für Äthanol) auf, die auf die Anwesenheit flüchtiger reduzierender Substanzen hinwiesen. Nach der Alkoholdehydrogenasemethode war der Harn äthylalkoholfrei.

Zusammenfassung

Nach Adalinaufnahme wurde im Harn als Abbauprodukt erstmals eine halogen- und stickstofffreie organische Säure gefunden und als α-Äthyl-α-Oxybuttersäure identifiziert. Sie kann bereits nach therapeutischer Aufnahme von Adalin im Ätherextrakt des sauren Harnes in Spuren, bei Adalinvergiftung in größeren Mengen beobachtet werden, wenn der Verdampfungsrückstand im Vakuum sublimiert wird. Für die Identifizierung in kleinen Mengen eignet sich am besten die Bestimmung der kristalloptischen Konstanten nach Isolierung der Substanz durch Vakuumsublimation im Wärmegradienten von M. Behrens.

Da ein natürliches Vorkommen der α-Äthyl-α-Oxybuttersäure im Körper nicht beobachtet wurde, kann das Auffinden dieser Säure im Harn als Beweis für eine Aufnahme von Bromdiäthylacetylcarbamid (Adalin) angesehen werden.

Literatur

Abelin, I., u. G. Poretti: Schweiz. med. Wschr. **1952**, 1186. — Averell, P.R., u. M. V. Norris: Analyt. Chem. **20**, 753 (1948). — Behrens, M.: Naturwissenschaften **41**, 1 (1954). — Berglund, Z.: Z. anal. Chem. **24**, 184 (1885). — Burgdorf, H.: Diss. Erlangen, noch unveröffentlicht. — Deisel, K.: Diss. Erlangen 1955. — Edler, W.: Diss. Bonn 1939. — Erlenmeyer, E. sen.: Zit. Silber, P. — Filipi, E.: Arch. Farmacol. sper. **12**, 233 (1911). — Frankland, E.: Liebigs Ann. **126**, 109. — Haushofer, K.: Z. Krystall. **1**, 619 (1877). — Impens, E.: Med. Klin. **1910**, 1861. — Ther. Gegenw. **1912**, 162. — Kofler, L., u. A.: Thermomikromethoden, Weinheim 1954.— Mannich, C., u. F. Zernik: Chem. Zbl. **1908**, 1831. — Arch. Pharmaz. **246**, 178 (1908). — Mantel, F.: Diss. Heidelberg 1949. — Meyer, R.: Ann. Chem. **219**, 240 (1883). — Moeschlin, S.: Klinik und Therapie der Vergiftungen. Stuttgart 1956. — Rosenmund, K. W.: Ber. dtsch. chem. Ges. **1907**, 4470. — Rosenmund, K. W., u. F. Hermann: Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **22**, 96 (1912). — Schäfer, P.: Münch. med. Wschr. **1910**, 2695. — Silber, P.: Diss. Freiburg. 1877. — Späth-Kaiser: Chemische und mikroskopische Untersuchung des Harns. Leipzig 1936. — Takeda, S.: Arch. internat. Pharmacodynamic **21**, 203 (1911). — Toxopéus, M. A. B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **149**, 263 (1930). — Walz, K. F.: Diss. Erlangen 1954. — Wojahn, K.: Diss. Kiel. 1938.

Dr. G. Schmidt, Erlangen, Institut f. ger. Medizin u. Kriminalistik d. Univ., Krankenhausstr. 8

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 75—81 (1956)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. H. Reinwein)

Sulfonamidkonzentrationen im Serum nach Verabreichung kombinierter Sulfonamide

Von

F. Portwich und H. Büttner

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. April 1956)

Die Einführung von Sulfakombinationspräparaten in die Therapie durch Hagerman[5], Frisk u. a.[3, 4] sowie Lehr[12, 13] erfolgte vor allem, um eine Konkrementbildung in den ableitenden Harnwegen zu verhindern, nachdem aus den experimentellen Arbeiten von Lehr[12], Hagerman[5] sowie Sjögren u. Örtenblad[17] geschlossen werden konnte, daß sich die Komponenten eines Sulfonamidgemisches in ihrer Löslichkeit gegenseitig nicht beeinflussen, d. h., daß die Löslichkeiten der Komponenten sich addieren. Aus den Untersuchungen verschiedener Autoren[6, 8, 9] geht hervor, daß der Sulfonamidgehalt im Serum nach Verabreichung eines Kombinationspräparates einer Addition der Komponenten entspricht.

Sulfonamide werden aus dem Blut im Sinne eines einfachen, exponentiellen Zeitgesetzes eliminiert[1, 2, 18]. Unter der Annahme, daß die Komponenten eines Sulfonamidgemisches sich in ihrer Ausscheidung gegenseitig nicht beeinflussen, ergeben sich auch für die Elimination von Kombinationspräparaten einfache mathematische Zeitgesetze (Dost [a. a. O. S. 66 ff.]).

Wir haben die Kinetik der Konzentrationsänderungen von Sulfonamiden und ihren Kombinationen im Serum des Menschen mit 4-Sulfanilamido-2,6-dimethyl-pyrimidin* („Sulfadimethylpyrimidin")** und 2-Sulfanilamido-4-methylpyrimidin („Sulfamerazin") experimentell untersucht.

Methodik

1. Die Bestimmung des freien und acetylierten Sulfonamids erfolgte nach der Methode von Krebs u. Franke[10], die sich uns bereits in früheren Untersuchungen[15] bewährt hatte. Bei der Anwendung dieser Methode auf die Sulfamerazin-Bestimmung ergab sich ein etwas anderer Extinktionskoeffizient für den gebildeten Azfarbstoff ($\varepsilon_{546\,nm} = 730\ cm^2 \cdot mol^{-1}$ [bezogen auf Sulfonamid]) als bei der Sulfadimethylpyrimidin-Bestimmung ($\varepsilon_{546\,nm} = 640\ cm^2 \cdot mol^{-1}$).

* Diese Bezeichnung ist identisch mit 6-Sulfanilamido-2,4-dimethylpyrimidin.

** „Aristamid" (Wz.) Nordmark Werke; „Elkosin" (Wz.) Ciba AG.

Der mittlere Fehler bei der Bestimmung von freiem Sulfamerazin, bei 10 bis 15 mg-% Serumgehalt, beläuft sich auf etwa ± 0,6%, bei der Bestimmung von gesamtem Sulfamerazin auf etwa ± 1,1%. Entsprechende Angaben für die Sulfadimethylpyrimidin-Bestimmung siehe[15]*.

Ein Teil der Analysen wurde unabhängig voneinander an zwei verschiedenen Stellen ausgeführt, sie ergaben gleiche Werte. Zusätzlich wurde das freie Sulfonamid mit der von Kimmig[7] angegebenen Methode bestimmt, es zeigte sich dabei gute Übereinstimmung mit den nach der Methode von Krebs u. Franke[10] gewonnenen Ergebnissen.

Bei der Untersuchung der Serum-Sulfonamidwerte nach Verabreichung von Sulfonamidkombinationen ist die getrennte Erfassung der einzelnen Komponenten schwierig. Wir wählten deshalb für unsere Untersuchungen Komponenten, deren unterschiedliche Extinktion bei der photometrischen Bestimmung etwa durch die Verschiedenheit des Molekulargewichtes kompensiert wird. Infolgedessen ist der methodische Fehler bei der Bestimmung des kombinierten Sulfonamids gering.

2. Bestimmung der kinetischen Konstanten. Die Ermittlung der Eliminationskonstanten (k_2) erfolgte nach i.v. Verabreichung von Sulfadimethylpyrimidin in 33%iger Lösung bzw. Sulfamerazin in 10%iger Lösung an gesunden Normalpersonen, welche die übliche Klinikkost erhielten. Über einen Zeitraum von mindestens 48 Std wurde die Serumkonzentration an freiem und gesamtem Sulfonamid verfolgt. Die Eliminationskonstante wurde nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Blut und Gewebe bestimmt nach der Gleichung

$$y = a \cdot e^{-k_2 t}, \tag{1}$$

worin y die Serumkonzentration in Milligramm-Prozent, a den fiktiven Serumspiegel zur Zeit $t = 0$, t die Zeit in Stunden und k_2 die Eliminationskonstante in Stunden^{-1} darstellt (vgl. dazu[1]). Die Eliminationskonstante k_2 läßt sich nach der Beziehung

$$t_{\text{halb}} = \frac{\ln 2}{k_2} \tag{2}$$

in die Halbwertszeit umrechnen.

Zur Berechnung der Invasions- oder Resorptionskonstanten wurde nach peroraler Verabreichung von Sulfonamiden die Zeit $t_{\max}$ (in Stunden) bestimmt, in welcher der Serumspiegel an Sulfonamid sein Maximum erreicht. Aus $t_{\max}$ wurde mit der oben ermittelten Eliminationskonstanten k_2 nach einem von Dost (a. a. O.S. 122) angegebenen Verfahren unter Benutzung der Funktion

$$k_2 \cdot t_{\max} = \frac{1}{\frac{k_1}{k_2} - 1} \cdot \ln \frac{k_1}{k_2} \tag{3}$$

die Invasionskonstante (k_1) errechnet.

Das absolute Verteilungsvolumen (in Milliliter) ergibt sich nach

$$\text{Vol (ml)} = \frac{\text{Dosis (mg)} \cdot 100}{a\ (\text{mg-}\%)} \tag{4}$$

Einsetzen der Werte in die Gleichung

* Zur Klärung der Frage, ob bei der von uns angewandten Enteiweißungsmethode mit Acetatpuffer Sulfonamid im Eiweißniederschlag bleibt und so der Bestimmung entzogen wird, wurde in den Laboratorien der Nordmark Werke Hamburg (Dr. Loop) der Eiweißniederschlag von sulfonamidhaltigem Serum auf Sulfonamide untersucht; dabei konnte kein Sulfonamid nachgewiesen werden. Ferner wurden zu nativem Serum zugesetzte Mengen an Sulfadimethylpyrimidin und Sulfamerazin stets quantitativ wiedergefunden.

$$\text{Clearance}_{tot}\,(\text{ml/min}) = \frac{k_2\,(\text{Std}^{-1}) \cdot \text{Vol}\,(\text{ml})}{60} \quad (5)$$

ergibt die totale Clearance nach NEWMAN u. a.[14].

Die Streuung der einzelnen Werte wurde als Standardabweichung

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{v^2}{n-1}}$$

berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen an den Sulfonamiden Sulfadimethylpyrimidin und Sulfamerazin bei getrennter Verabreichung sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Für den Fall, daß sich diese beiden Sulfonamide bei *kombinierter Verabreichung* im Verhältnis 1 : 1 nicht beeinflussen, gilt für den Serumgehalt an Sulfonamid

$$y = a^{I} \cdot e^{-k_2^{I} \cdot t} + a^{II} \cdot e^{-k_1^{II} \cdot t}, \quad (6)$$

wobei sich die Indices I und II auf die Komponenten beziehen (vgl. DOST [a. a. O. S. 68]). Die Summe zweier Exponentialfunktionen, wie sie in Gl. (6) vorliegt, ergibt im Gegensatz zur einfachen Exponentialfunktion $y = e^x$, aufgetragen auf halblogarithmischem Papier (Logarithmus der Konzentration

Tabelle 1. *Kinetische Konstanten von Sulfadimethylpyrimidin und Sulfamerazin*

		Sulfadimethylpyrimidin	σ	Sulfamerazin	σ
Eliminationskonstante für freies Sulfonamid	$k_2\,(\text{Std}^{-1})$	0,079	± 0,007	0,039	± 0,007
Eliminationskonstante für gesamtes Sulfonamid	$k_2^{+}\,(\text{Std}^{-1})$	0,064	± 0,009	0,034	± 0,003
Invasionskonstante	$k_1\,(\text{Std}^{-1})$	1,15		0,47	
Zeit bis zum Erreichen des max. Serumspiegels	t_{max} (Std)	2,5	± 0,6	5,8	± 0,3
Fiktiver Serumspiegel zur Zeit $t = 0$, bei einer Dosis von 3 g i. v. und einem Körpergewicht von 70,0 kg	a (mg-%)	13,0	± 2,1	18,5	± 2,1
Absolutes Verteilungsvolumen	Vol (ml)	23100	± 3200	16200	± 2000
Relatives Verteilungsvolumen in Prozent des Körpergewichtes		33	± 5	23	± 3
Totale Clearance	ml/min	30,4	± 1,2	10,5	± 1,2

gegen die Zeit), keine Gerade. Aus diesem Grunde ist für die Elimination einer Sulfakombination die Berechnung einer Konstanten k_2 sowie eines Verteilungsvolumens nicht möglich. Die Übereinstimmung unserer ex-

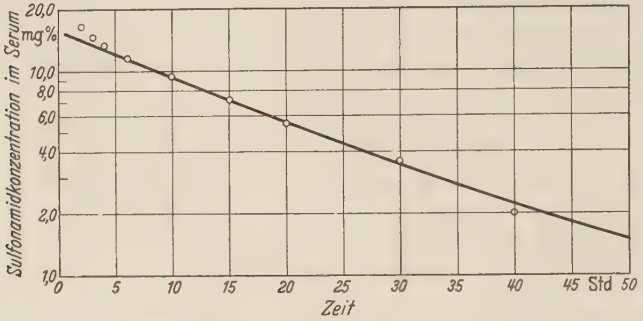


Abb. 1. Serumspiegel an freiem Sulfonamid nach i.v. Verabreichung eines Sulfakombinationspräparates (je 1,5 g Sulfadimethylpyrimidin (I) und Sulfamerazin (II). ○ experimentelle Werte (Mittel aus 3 Versuchen), — berechneter Konzentrationsablauf nach Gl. (6) mit den Zahlenwerten $k_2^{\mathrm{I}} = 0{,}079$ Std^{-1}, $k_2^{\mathrm{II}} = 0{,}039$ (Std^{-1}), $a^{\mathrm{I}} = 6{,}5$ mg-%, $a^{\mathrm{II}} = 9{,}3$ mg-%

perimentellen Ergebnisse bei der Elimination einer intravenös verabreichten Kombination von je 1,5 g Sulfadimethylpyrimidin und Sulfamerazin mit der Funktion Gl. (6) zeigt Abb. 1.

Der Serumgehalt an Sulfonamid nach *peroraler* Verabreichung zeigt einen komplizierteren Verlauf als nach intravenöser Verabreichung, wie

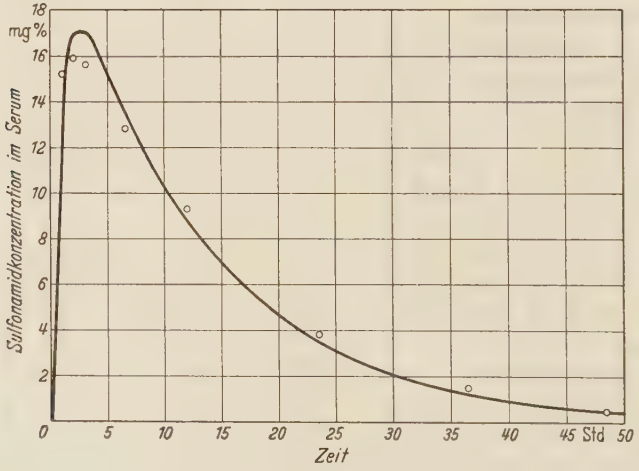


Abb. 2. Serumspiegel an freiem Sulfonamid nach peroraler Verabreichung von 3 g Sulfadimethylpyrimidin. ○ experimentelle Werte, — berechnete Werte nach Gleichung

$$y = a \cdot \frac{k_1}{k_1 - k_2} \left(e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}\right) \tag{9}$$

mit den Zahlenwerten $k_1 = 1{,}15$ Std^{-1}, $k_2 = 0{,}079$ Std^{-1}, $a = 21$ mg-% (berechnet aus Dosis und Körpergewicht)

von Teorell[18], Druckrey u. Küpfmüller[2] sowie Dost[1] theoretisch abgeleitet wurde. Unsere nach peroraler Gabe von Sulfadimethylpyrimidin oder Sulfamerazin gefundenen Werte lassen sich durch die von diesen Autoren abgeleitete Funktion beschreiben, wie dies an einem Beispiel in Abb. 2 dargestellt ist. Die nach peroraler Zufuhr unseres Sulfonamid*gemisches* erhaltenen Serumkonzentrationen bestätigen ebenfalls

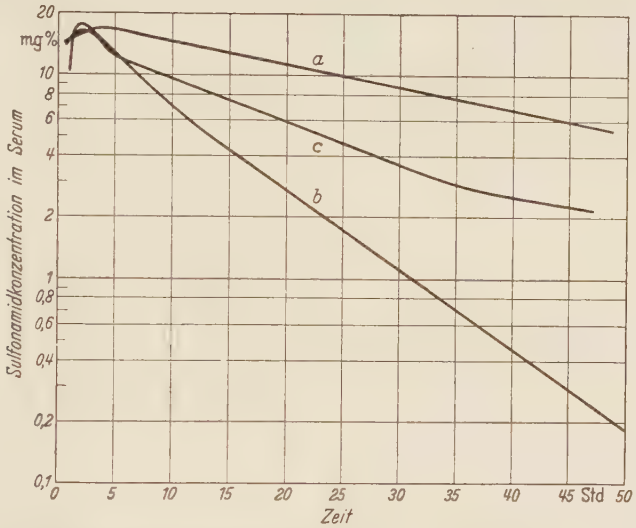


Abb. 3. Serumspiegel nach peroraler Verabreichung von 3 g Sulfamerazin (a), 3 g Sulfadimethylpyrimidin (b) und einem Gemisch von je 1,5 g Sulfamerazin und Sulfadimethylpyrimidin (c)

die Annahme einer Addition (siehe Abb. 3), doch ist in diesem Fall die theoretische Beziehung relativ verwickelt, so daß wir von einem Vergleich mit unseren experimentellen Werten abgesehen haben.

Der *Anteil der acetylierten Verbindung* am Gesamtsulfonamid (Acetylierungsgrad) ist von der Verweildauer des Sulfonamids im Organismus abhängig. Infolgedessen genügt es nicht, zur Charakterisierung eines Sulfonamids einen „Acetylierungsgrad" anzugeben. Es zeigt sich jedoch, daß die Acetylierungsgrade in ihrer Abhängigkeit von der Zeit einer Exponentialfunktion folgen. Trägt man log [1—Acetylierungsgrad] gegen die Zeit auf (ein Beispiel zeigt Abb. 4), so erhält man eine Gerade, für die die Gleichung

$$[1\text{—Acetylierungsgrad}] = c \cdot e^{-k_3 t} \qquad (7)$$

gilt, in der k_3 ein Maß für die Abnahme des freien Sulfonamids und somit für die Acetylierungsgeschwindigkeit und c eine Konstante ist.

Die sich aus den Serumwerten an *freiem* Sulfonamid ergebende Elimination (Eliminationskonstante k_2) setzt sich einerseits aus der reinen Elimination (Ausscheidung durch Niere, Leber, Magen-Darm usw. sowie

Abwanderung ins Gewebe und Abbau) andererseits aus dem durch Acetylierung der Bestimmung entgehenden Anteil zusammen. Letzterer Anteil an der Elimination wird durch die Konstante k_3 charakterisiert. Die Elimination, die sich aus den *Gesamt*-Sulfonamidwerten im Serum ergibt (Eliminationskonstante k_2^+), ist geringer, da die Acetylierung sich hierbei ja nicht bemerkbar macht. Unsere experimentellen Ergebnisse, die in Tab. 2 zusammengefaßt sind, entsprechen diesen Annahmen und zeigen, daß die Beziehung gilt:

$$k_2 = k_3 + k_2^+ . \qquad (8)$$

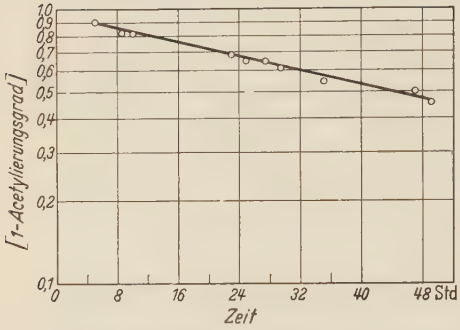


Abb. 4. (1-Acetylierungsgrad) nach Gl. (7). Experimenteller Werte nach i.v. Verabreichung von 3 g Sulfadimethylpyrimidin(○)

Zur mathematischen Ableitung einer derartigen Gleichung siehe näheres bei Dost (a. a. O. S. 46).

Bei Sulfa-*Kombination* fanden wir in Übereinstimmung mit der Literatur[11, 13, 16] u. a. eine geringere Acetylierung als theoretisch anzunehmen ist. Über hierfür verantwortliche Faktoren kann zur Zeit nichts Sicheres ausgesagt werden.

Aus unseren Versuchsergebnissen folgt, daß die Sulfonamid-Serumkonzentration nach intravenöser wie auch nach peroraler Verabreichung eines *Gemisches* von Sulfadimethylpyrimidin und Sulfamerazin einfachen

Tabelle 2. *Experimentell gefundene und nach Gl. (8) berechnete Werte für die Eliminationskanstante k_2 (Std^{-1})*

Versuch Nr.		k_2	
		experimentell	berechnet n. Gl. (8)
1	Sulfadimethylpyrimidin	0,078	0,078
2	„	0,074	0,079
3	„	0,084	0,084
4	„	0,089	0,093
5	Sulfamerazin	0,046	0,053
6	„	0,040	0,040

mathematischen Zeitgesetzen entspricht. Hieraus kann geschlossen werden, daß die beiden Sulfonamide sich bei gleichzeitiger Ausscheidung nicht beeinflussen. Die Serum-Konzentrationen einer jeden Komponente eines Sulfonamidgemisches verhalten sich also so, als ob die andere Komponente nicht vorhanden wäre. Es resultiert dann die von verschiedenen Autoren[6, 8, 9] schon beobachtete „Addition der Sulfonamidkomponenten" im Serum.

Für ihre Hilfe danken wir Fräulein M. v. Graffen. Den Nordmark Werken Hamburg möchten wir auch an dieser Stelle für die Überlassung von Sulfonamidversuchsmengen sowie anderweitige Unterstützung danken.

Zusammenfassung

1. Es wurden die kinetischen Konstanten, von denen die Konzentrationsabläufe im Serum abhängen, für das 6-Sulfadimethylpyrimidin und das Sulfamerazin experimentell bestimmt.

2. Mit Hilfe dieser Konstanten und theoretischer Überlegungen wurden Gleichungen für den Konzentrationsablauf bei Verabreichung kombinierter Sulfonamide abgeleitet und experimentell bestätigt.

3. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß 6-Sulfadimethylpyrimidin und Sulfamerazin sich bei der Ausscheidung gegenseitig nicht beeinflussen.

Literatur

[1] Dost, F. H.: Der Blutspiegel. Leipzig 1953. — [2] Druckrey, H., u. K. Küpfmüller: Dosis und Wirkung. Pharmazie, 1. Erg.b., 8. Beih. Berlin 1949. — [3] Frisk, R., G. Hagerman, S. Helander u. B. Sjögren: Nord. Med. **29**, 639 (1946). — [4] Frisk, G., G. Hagerman, S. Helander and B. Sjögren: Brit. Med. J. **1947**, I, 7. — [5] Hagermann, G.: Nord. Med. **22**, 1223 (1944). — [6] Hinrichs, K. J.: Zbl. Chir. **77**, 257 (1952). — [7] Kimmig, J.: Erg. Hyg. **24**, 396 (1941). — [8] Kimmig, J.: Wien. med. Wschr. **1950**, 85. — [9] Klamroth, J.: Dtsch. med. Wschr. **1949**, 1503. — [10] Krebs, K. G., u. H. Franke: Klin. Wschr. **1939**, 1248. — [11] Ledbetter, J., and G. Cronheim: Amer. J. Med. Sci. **216**, 27 (1948). — [12] Lehr, D.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **58** 11 (1945). — [13] Lehr, D.: J. of Urol. **55**, 548 (1946). — [14] Newman, E. V., J. Brodey and J. Winternitz: Bull. Johns Hopkins Hosp, **75**, 253 (1944). — [15] Portwich, F., H. Büttner u. J. Paulini: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 123 (1955). — [16] Schlotmann, H., u. H. Niggeschmidt: Med. Klin. **1950**, 356. — [17] Sjögren, B., u. B. Örtenblad: Acta chem. scand. (Copenh.) **1**, 605 (1947). — [18] Teorell, T.: Arch. internat. Pharmakodynamie **57**, 205, 226 (1937).

Dr. F. Portwich, Kiel, Medizin. Univ.-Klinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 82—91 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens)

Beitrag zur Beurteilung der antifibrillären Eigenschaft des Chinidins und ähnlich wirksamer Substanzen*

Von
Hans Friedrich Benthe

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. März 1956)

Obwohl über die irregulären Erregungsabläufe im Herzmuskel zwei grundsätzlich verschiedene theoretische Vorstellungen vorliegen: „circus movements"- oder „ectopic focus"-Theorie, so wird in der Verlängerung der Refraktärzeit das gemeinsame antagonistische Prinzip gesehen (Dawes 1952). In diesem Sinne wirkt das Chinidin; es verlängert zwar die refraktäre Phase des Herzmuskels, damit wirkt es flimmerwidrig, gleichzeitig senkt es aber auch die Erregungsleitungsgeschwindigkeit und begünstigt damit irreguläre Erregungsabläufe. Der Erfolg einer Chinidinbehandlung hängt also davon ab, welche der beiden Eigenschaften überwiegt (Schaefer 1951).

Neben dem Chinidin sind heute noch andere Stoffe mit antifibrillären Eigenschaften bekannt, so das Novocain, das Novocainamid und das α-Fagarin. Ihre bisherige pharmakologische Prüfung bestand im Vergleich ihrer Schutzwirkung gegenüber künstlich erzeugten Arrhythmien. Ein Vergleich ihrer Wirkung auf die entscheidenden elektrischen Grundeigenschaften des Herzmuskels, auf Refraktär- und Leitungszeit fehlt. Es erschien uns daher sinnvoll, diese beiden Größen am Herzmuskelpräparat des Frosches in Reihenversuchen zu bestimmen. Folgende Stoffe wurden geprüft: Chinin, Chinidin, α-Fagarin, Novocain (Procain), Novocainamid (Procainamid), Ajmalin und Serpentin.

Methode

Die Untersuchungen wurden ausgeführt am Ventrikelstreifen des Froschherzens (Rana temporaria) in den Monaten Oktober—Februar. Zur Messung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit diente das von Bammer u. Rothschuh (1952) angegebene Verfahren mit geringfügigen Abänderungen (Benthe 1954). Als absolute Refraktärzeit bestimmten wir den zeitlichen Abstand zweier Aktionsströme im Bereich der maximalen Folgefrequenz bei kontinuierlich ansteigender Reizfrequenz; über Einzelheiten des Meßvorganges ist in einer vorangehenden Arbeit berichtet (Benthe 1956). Die Ruhereizfrequenz zwischen den einzelnen Messungen von Leitungs- und

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Refraktärzeit betrug 0,5 Hz. Zur Beurteilung der Kontraktionsfähigkeit wurden die Kontraktionen des mit 0,5 Hz gereizten Muskelstreifens in isotonischer Anordnung auf Rußkymo registriert. Die normale Ringer-Lösung hatte folgende Zusammensetzung: 100 H_2O, 0,6 NaCl, 0,021 KCl, 0,024 $CaCl_2$, 0,03 $NaHCO_3$. Die Versuchskonzentrationen aller Substanzen wurden jeweils aus einer wäßrigen Stammlösung (10^{-3}) durch Ringer-Verdünnung hergestellt. Die Substanzeinwirkung betrug 15 min, während dieser Zeit erfolgte alle 3 min eine Messung. Mit einem anschließenden Ringer-Bad (15 min) prüften wir die Auswaschbarkeit. In normaler Ringer-Lösung war der Durchschnittswert der Erregungsleitungsgeschwindigkeit 7 cm/sec und die absolute Refraktärzeit 0,65 sec.

Versuchsergebnisse

1. Chinin und Chinidin. Als erstes Pharmakon gegen Herzirregularitäten wurde Chinin angewandt. In der Folgezeit wurde es durch Chinidin abgelöst, dem eine stärkere Herzwirksamkeit eigen ist. Die am Gesamtorganismus festgestellten depressiven Effekte auf die Herzerregung: Verlängerung der Refraktärzeit, Senkung der Leitungsgeschwindigkeit und Erregbarkeitsabnahme sind nur zum Teil die Folge einer direkten Herzwirkung. Sie wird nämlich ergänzt durch die vagolytischen Eigenschaften der Substanz. Da die genannten Herzwirkungen auch dann auftreten, wenn in tiefer Narkose die sonst beobachtete Frequenzsteigerung ausbleibt, ist in dem direkten Einfluß auf das Herz selbst die dominierende Wirkungskomponente zu sehen. Daher sind die erregungsdämpfenden Einflüsse auch am isolierten Präparat festzustellen. Einheitliches Ergebnis aller direkten Messungen ist eine Verzögerung sämtlicher Leitungsvorgänge, sowohl der a-v-Überleitung als auch der intraventrikulären Leitung, die bei toxischer Dosierung zum Leitungsblock führt (Lewis u. Mitarb. 1922, Wedd u. Blair 1951). Weiterhin ergaben direkte Messungen an freigelegten Hundeherzen (Lewis 1922) bei klinisch vergleichbaren Chinidingaben eine erhebliche Verlängerung der Refraktärzeit um maximal 50—100%. Den qualitativ gleichen Befund erheben di Palma u. Mascatello (1951) am isolierten Herzmuskel der Katze. Auch Bijlsma u. van Dongen (1939) bestätigen eine Verlängerung der Refraktärzeit unter Chinidin.

Das Ergebnis unseres experimentellen Vergleichs von Leitungsgeschwindigkeit und Refraktärzeit unter Chinidin- und Chinineinfluß ist in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. *Änderung von Erregungsleitungsgeschwindigkeit (LG) [cm/sec] und absoluter Refraktärzeit (R) [sec] unter Einwirkung von Chinidin- und Chininsulfat*

...w. Zeit (min)		Chinidin 10^{-5}	Chinidin 10^{-4}	Chinin 10^{-5}	Chinin 10^{-4}
3	LG	— 0,6 ± 0,08	— 2,1 ± 0,44	— 0,4 ± 0,17	— 0,7 ± 0,12
	R	0	+ 0,05 ± 0,013	0	+ 0,05 ± 0,014
6	LG	— 0,8 ± 0,12	— 2,5 ± 0,47	— 0,6 ± 0,15	— 1,8 ± 0,17
	R	+ 0,05 ± 0,018	+ 0,25 ± 0,071	0	+ 0,18 ± 0,038
15	LG	— 2,0 ± 0,16	— 4,7 ± 0,58	— 1,4 ± 0,09	— 3,7 ± 0,21
	R	+ 0,17 ± 0,038	+ 0,42 ± 0,115	+ 0,09 ± 0,024	+ 0,33 ± 0,036
...traktionsab-					
...me in Prozent		0	— 56	0	— 90
...ger 15 min	LG	— 1,3 ± 0,15	blockiert	— 1,3 ± 0,25	— 4,0 ± 0,31
	R	+ 0,17 ± 0,025	kein AS	+ 0,13 ± 0,039	+ 0,42 ± 0,09

Mit diesem Ergebnis wird für den Erregungsvorgang im Herzmuskel eine stärkere Wirksamkeit des Chinidins bestätigt, während die Kontraktionsfähigkeit gegenüber Chinin empfindlicher ist. Hinsichtlich der Herzerregung steht die depressive Wirkung auf die Leitungsgeschwindigkeit im Vordergrund, ihre Abnahme übertrifft die Zunahme der Refraktärzeit, wie die prozentuale Verschiebung gegenüber den Ausgangswerten zeigt (Abb. 1). Auffallend ist dabei die gegenüber der Erregungsleitung verspätet einsetzende Reaktion der Refraktärzeit, erst 6 min nach Substanzeinwirkung ergibt sich ein annähernd paralleler Verlauf beider Größen. Die Effekte beider Substanzen sind durch anschließendes Ringer-Bad nicht auswaschbar, unter Chinidin 10^{-4} kommt kein normaler Aktionsstrom mehr zustande, dementsprechend erlischt die Leitfähigkeit.

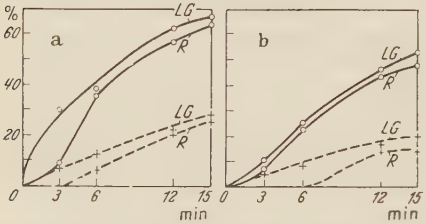


Abb. 1. Prozentuale Änderung von Leitungsgeschwindigkeit (LG) und Refraktärzeit (R) unter Chinidin- (a) und Chinineinwirkung (b). + – – – + 10^{-5}, o———o 10^{-4}

Ähnliche Untersuchungen am Froschherzen sind aus der Literatur nicht bekannt, man hat sich meistens auf chronaxiemetrische Messungen beschränkt.

Nach Wendhut u. Lendle (1951) erhöht Chinidin 10^{-5} die elektrische Flimmerschwelle des Froschventrikels ohne die Chronaxie zu verlängern; man folgerte, daß trotz „flimmerwidriger" Wirksamkeit die Erregungsleitung nicht beeinträchtigt wird, obwohl im EKG Verbreiterungen des QRS-Komplexes beobachtet wurden. Dieser Widerspruch klärt sich mit unserem Befund, wonach durch Chinidin 10^{-5} eindeutige Leitungsverzögerungen hervorgerufen werden, die maximal sogar 30% betragen.

2. Novocain und Novcainamid. Die antagonistischen Effekte des Novocains gegenüber allen Formen experimentell erzeugten Herzflimmerns sind aus zahlreichen Arbeiten bekannt. Mit Erfolg ist es auch beim Kammerflimmern, bei Extrasystolie und paroxysmaler Tachykardie des menschlichen Herzens angewandt worden (v. Boros 1951). Eine Analyse der antifibrillären Eigenschaften führte zu keinem einheitlichen Ergebnis. Einerseits beobachtete man eine Abnahme von Erregbarkeit, Erregungsleitung und eine Zunahme der Refraktärzeit (Hazard 1948). Entsprechend führten Brown u. Acheson (1951) nach experimentellen Befunden am flatternden Hundeherzen die Schutzwirkung des Novocains auf Verlängerung der Refraktärzeit zurück. Andererseits soll die Refraktärzeit trotz flimmerwidriger Wirksamkeit unbeeinflußt bleiben (Wedd u. Blair 1951). Am Froschherzen fanden Wendhut u. Lendle (1951) eine Senkung der elektrischen Flimmerschwelle unter Novocain 10^{-5}, parallel dazu ging eine Zunahme der Chronaxie und eine Verbreiterung von QRS.

Wegen seiner längeren Wirkungsdauer kommt bei Herzarrhythmien heute das Novocainamid bevorzugt zur Anwendung. Auch hier werden die Teilwirkungen verschieden beurteilt: Woske u. Mitarb. (1953) beobachteten eine Refraktärzeitverlängerung, während van Dongen (1953) im therapeutischen Bereich keinen Einfluß auf Refraktär- und Leitungszeit feststellen konnte.

Unser Ergebnis ist in Tab. 2 wiedergegeben.

Wir erhalten also schon mit Novocain 10^{-5} eine signifikante Abnahme der Erregungsleitung, wie dies von WENDHUT u. LENDLE (1951) gefolgert wurde. Auch hier reagiert wie unter Chinidin der Leitungsvorgang am empfindlichsten, er wird schon mit einer Dosis (10^{-5}) verzögert, welche die Refraktärzeit unbeeinflußt läßt. Die höheren Konzentrationen verlängern Refraktär- und Leitungszeit erheblich, die maximale Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit beträgt 90%. Die gleichen dämpfenden Eigenschaften hat das Novocainamid, nur sind sie bei gleicher Dosierung schwächer und erreichen maximal nur ein Drittel der Novocainwirkung.

Aus der Literatur geht über den experimentellen Wirkungsvergleich beider Stoffe kein eindeutiges Ergebnis hervor. Nach SZEKELY u. WYNNE (1954) ist zur Beseitigung ventrikulärer Extrasystolien (Katze) Novocainamid dreifach höher zu dosieren als isoeffektives Novocain. Demgegenüber liegen nach VAN DONGEN (1953) die gegen elektrisch ausgelöstes Flimmern (Katze) minimal wirksamen Dosen in gleicher Höhe, während signifikante Änderungen im Leitungs- und

Tabelle 2. *Änderung von Erregungsleitungsgeschwindigkeit (LG) [cm/sec] und absoluter Refraktärzeit (R) [sec] unter Novocain- und Novocainamideinwirkung*

Einw. Zeit (min)		Nov. 10^{-5}	Nov. $5 \cdot 10^{-5}$	Nov. 10^{-4}	Nov. A. $5 \cdot 10^{-5}$	Nov. A. 10^{-4}
3	LG	$-0{,}8 \pm 0{,}13$	$-2{,}9 \pm 0{,}54$	$-4{,}1 \pm 0{,}32$	$-0{,}6 \pm 0{,}18$	$-0{,}9 \pm 0{,}21$
	R	0	$+0{,}12 \pm 0{,}068$	$+0{,}30 \pm 0{,}053$	0	0
6	LG	$-0{,}8 \pm 0{,}16$	$-3{,}6 \pm 0{,}74$	$-5{,}2 \pm 0{,}40$	$-1{,}0 \pm 0{,}29$	$-1{,}6 \pm 0{,}33$
	R	0	$+0{,}16 \pm 0{,}048$	$+0{,}42 \pm 0{,}032$	$+0{,}05 \pm 0{,}026$	$+0{,}08 \pm 0{,}029$
15	LG	$-0{,}7 \pm 0{,}12$	$-4{,}1 \pm 0{,}58$	$-6{,}3 \pm 0{,}33$	$-1{,}3 \pm 0{,}25$	$-2{,}1 \pm 0{,}36$
	R	0	$+0{,}21 \pm 0{,}042$	$+0{,}50 \pm 0{,}068$	$+0{,}14 \pm 0{,}039$	$+0{,}25 \pm 0{,}031$
Kontraktionsabnahme in Prozent		0	— 30	— 60	— 13	— 60
Ringer 6 min	LG	0	— 0,4	$-1{,}0 \pm 0{,}19$	$-1{,}0 \pm 0{,}23$	$-1{,}5 \pm 0{,}39$
	R	0	+ 0,03	+ 0,07	$+0{,}12 \pm 0{,}035$	$+0{,}21 \pm 0{,}044$
15 min	LG	0	— 0,2	— 0,4	$-0{,}75 \pm 0{,}22$	$-1{,}3 \pm 0{,}26$
	R	0	0	0	$+0{,}05 \pm 0{,}019$	$+0{,}18 \pm 0{,}053$

Erholungsvorgang unter Novocainamid schon mit der Hälfte der Novocaindosis zu erreichen sind.

Diese Befunde sind jedoch mit unseren Ergebnissen nur bedingt vergleichbar und bilden nur einen scheinbaren Widerspruch. Denn in Versuchen am Ganztier ist der schnelle Wirkungsverlust des Novocains durch Hydrolyse zu berücksichtigen, dem das Novocainamid nicht unterworfen ist (Mark u. Mitarb. 1951).

Trotz der qualitativen Gleichartigkeit von Novocain und Novocainamid scheint aber in der Wirkungsweise beider Stoffe ein grundsätzlicher Unterschied zu bestehen. Beim Novocain steht der Einfluß auf den Erregungsvorgang im Vordergrund, so wird z. B. bei gleicher Abnahme der Kontraktionsfähigkeit um 60% die Leitungsgeschwindigkeit unter Novocain (10^{-4}) dreifach stärker gesenkt als unter Novocainamid (10^{-4}). Die Änderung von Leitungs- und Refraktärzeit unter Novocain stellt eine Sofortreaktion dar, sie tritt schlagartig ein und ist nach Auswaschen ebenso schnell reversibel (Abb. 2). Demgegenüber setzt die Novocainamidwirkung allmählich ein und ist kaum reversibel. Unter diesem Gesichtspunkt steht das Novocainamid wirkungsmäßig dem Chinidin näher als dem Novocain. Wie beim Chinidin folgen die Refraktärzeitänderungen den Leitungsänderungen mit erheblicher zeitlicher Verspätung, übertreffen diese dann aber bei prozentualer Beziehung auf die Ausgangswerte (Abb. 3). Das Verhältnis von Refraktärzeit- zur Leitungsänderung liegt beim Novocainamid günstiger, bei Verlängerung der Refraktärzeit um 20 bzw. 30% sinkt die Leitungsgeschwindigkeit beim Novocainamid um 20%, beim Novocain um fast 60%.

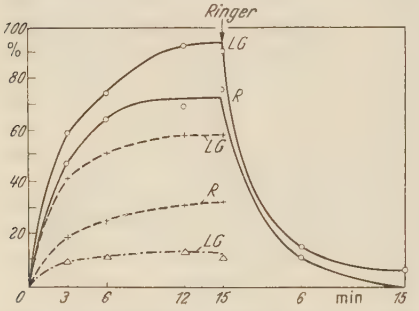


Abb. 2. Prozentuale Änderung von Leitungsgeschwindigkeit (LG) und Refraktärzeit (R) unter Novocaineinwirkung. △·—·—·△ 10^{-5}, +– – –+ $5 \cdot 10^{-5}$, ○————○ 10^{-4}

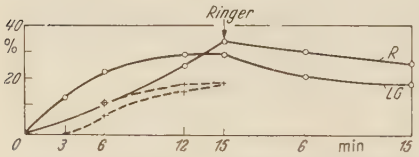


Abb. 3. Prozentuale Änderung von Leitungsgeschwindigkeit (LG) und Refraktärzeit (R) unter Novocainamideinwirkung, +– – –+ $5 \cdot 10^{-5}$, ○————○ 10^{-4}

3. α-Fagarin. Mit dem α-Fagarin, einem Alkaloid aus Fagara coco (Südamerika) konnte schon Scherf (1948) beim Aconitinflimmern des Hundeherzens antagonistische Wirkungen erzielen. Sowohl die chemische Konstitutionsaufklärung als auch die grundlegenden pharmakologischen Untersuchungen wurden dann von Deulofen u. Mitarb. (1946, 1954) vorgenommen; sie fanden, daß α-Fagarin am Herzen chinidinähnlich wirkt und alle mit der Erregung zusammenhängenden Vorgänge dämpft. Im einzelnen verlängert es die Refraktärzeit und verlangsamt die Erregungsleitung. Die Chronaxie des Krötenherzens soll sogar stärker gesenkt sein als unter Chinidin (Moisset de Espanes 1937). Eine flimmerwidrige Wirkung am isolierten

Katzenherzen wurde von Tripod (1951) beobachtet. Die maximale Folgefrequenz des isolierten Meerschweinchenaurikels wird gesenkt (Alles u. Ellis 1948). Entsprechende therapeutische Erfolge beim Flattern und Flimmern des menschlichen Herzens wurden von Tacquini (1947) bekanntgegeben. Unsere Prüfung des α-Fagarins hatte das folgende Ergebnis (Tab. 3).

Tabelle 3. *Änderung von Erregungsleitungsgeschwindigkeit (LG) [cm/sec] und absoluter Refraktärzeit (R) [sec] unter α-Fagarin*

Einw. Zeit (min)		Fag. 10^{-6}	Fag. $5 \cdot 10^{-6}$	Fag. 10^{-5}	Fag. $5 \cdot 10^{-5}$
3	LG	+ 0,2	— 0,2	— 1,0 ± 0,35	— 1,5 ± 0,41
	R	0	0	0	+ 0,05 ± 0,022
6	LG	— 0,3	— 0,4	— 1,5 ± 0,35	— 2,6 ± 0,53
	R	0	0	+ 0,04 ± 0,021	+ 0,08 ± 0,029
15	LG	— 0,4	— 1,7 ± 0,17	— 2,5 ± 0,44	— 3,7 ± 0,51
	R	0	+ 0,08 ± 0,04	+ 0,16 ± 0,045	+ 0,21 ± 0,041
Kontraktionsabnahme in Prozent		0	0	0	40
Ringer 15 min	LG	— 0,2	— 0,5	— 1,4 ± 0,46	— 2,8 ± 0,57
	R	0	0	+ 0,06	+ 0,13 ± 0,025

Abgesehen von einer sehr kurzen positiv dromotropen Anfangswirkung von α-Fagarin (10^{-6}) wirken alle höheren Konzentrationen negativ dromotrop. Dabei ähnelt der Wirkungscharakter dem des Chinidin und Novocainamid. Auch hier wird die Refraktärzeit weit schwächer von der Alkaloidwirkung betroffen. Ihre Abnahme läuft der sinkenden Erregungsleitung parallel, bleibt aber auch mit ihrem Maximalwert noch 15% unter der Leitungsänderung. Es ist aber auf die starke Wirksamkeit des Alkaloids hinzuweisen, es ergeben sich schon ohne Beeinträchtigung der Kontraktilität bei einer Konzentration $5 \cdot 10^{-6}$ signifikante Änderungen beider Meßgrößen. Dieser Befund entspricht den Beobachtungen Tripods (1951), wonach durch Aconitin hervorgerufene Rhythmusstörungen des isolierten Katzenherzens durch α-Fagarin 10^{-6} gestoppt werden, während Novocain erst in der zehnfachen Konzentration wirksam ist.

4. Ajmalin und Serpentin. Nachdem schon Hartog (1935) am Frosch- und Katzenherzen nach Rauwolfin Frequenzabnahme und bei höherer Dosierung Überleitungsstörungen beobachtete, und van Dongen (1936) antifibrilläre Wirkungen des Rauwolfins beschrieben hatte, lag es nahe, die uns zur Verfügung stehenden Rauwolfia-Alkaliode: Ajmalin und Serpentin in unsere Untersuchung einzubeziehen. Das Ergebnis ist in Tab. 4 wiedergegeben.

Hiermit wird für das Ajmalin eine chinidinähnliche Herzwirksamkeit bestätigt, es verzögert weit stärker als die entsprechende Chinidindosis den Leitungs- und Erholungsvorgang mit einem langsamen Wirkungseintritt und fehlender Auswaschbarkeit. Abgesehen von der positiv dromotropen

Tabelle 4. *Änderung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit (LG) [cm/sec] und absoluter Refraktärzeit (R) [sec] unter Ajmalin- und Serpentineinwirkung*

Einw. Zeit (min)		Aj 10^{-6}	Aj. $5 \cdot 10^{-6}$	Aj. 10^{-5}	Serp. $5 \cdot 10^{-6}$	Serp. 10^{-5}
3	LG	$-0{,}3 \pm 0{,}04$	$-0{,}7 \pm 0{,}21$	$-1{,}0 \pm 0{,}14$	$+0{,}4$	$+0{,}3$
	R	0	$+0{,}07 \pm 0{,}024$	—	0	$+0{,}1 \pm 0{,}04$
6	LG	$-0{,}9 \pm 0{,}19$	$-1{,}3 \pm 0{,}021$	$-2{,}5 \pm 0{,}59$	$+0{,}2$	$-0{,}4 \pm 0{,}19$
	R	0	$+0{,}1 \pm 0{,}022$	—	0	$+0{,}16 \pm 0{,}03$
15	LG	$-1{,}6 \pm 0{,}41$	$-2{,}7 \pm 0{,}50$	$-3{,}9 \pm 0{,}67$	$-0{,}6$	$-1{,}8 \pm 0{,}18$
	R	$+0{,}07 \pm 0{,}017$	$+0{,}39 \pm 0{,}086$	—	0	$+0{,}25 \pm 0{,}042$
Kontraktionsabnahme in Prozent		0	28	76	0	0
Ringer 15 min	LG	$-1{,}3 \pm 0{,}40$	$-2{,}9 \pm 0{,}40$	$-3{,}6 \pm 0{,}73$	$-1{,}2$	$-2{,}7 \pm 0{,}31$
	R	$+0{,}05 \pm 0{,}028$	$+0{,}32 \pm 0{,}047$	—	0	$+0{,}25 \pm 0{,}081$

Anfangsphase entspricht auch das Serpentin diesem Typ. Der Einfluß beider Stoffe auf den Erregungsvorgang ist jedoch sehr stark, so daß schon unter Ajmalin 10^{-5} und Serpentin $5 \cdot 10^{-5}$ schwere Verformungen des Aktionsstromes auftreten, die exakte Refraktärzeitmessungen unmöglich machen; parallel dazu erlischt die Kontraktionsfähigkeit. Abweichend von allen bisher untersuchten Stoffen verlängern Ajmalin $5 \cdot 10^{-6}$ und

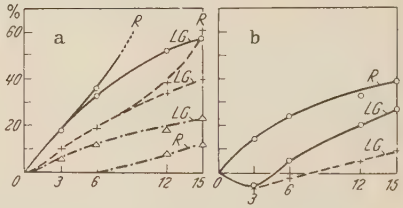


Abb. 4. Prozentuale Änderung von Leitungsgeschwindigkeit (LG) und Refraktärzeit (R) unter Ajmalin- (a) und Serpentin-(b)-Einwirkung. △·—·—·△ 10^{-6}, +———+ $5 \cdot 10^{-6}$, ○———○ 10^{-5}

Serpentin 10^{-5} die Refraktärzeit stärker als sie die Leitungsgeschwindigkeit senken (Abb. 4). Beim Ajmalin tritt dieser Effekt erst nach 6 min ein, hier überschneidet die Refraktärzeitzunahme die Leitungsabnahme, während Serpentin sogar trotz anfänglicher Leitungsförderung die Refraktärzeit verlängert, ohne die Kontraktionskraft zu schwächen.

Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse

Kennzeichnend für alle untersuchten Stoffe ist die Senkung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit und die Verlängerung der Refraktärzeit. Die Wirkungsweise ähnelt

der des Chinidins, d. h. die Wirkung setzt langsam ein und ist nur schwer oder gar nicht auswaschbar. Nur für das Novocain trifft diese gemeinsame Eigenschaft nicht zu, indem hier die Effekte schlagartig eintreten und im anschließenden Ringer-Bad völlig reversibel sind.

Der plötzliche Leitungsabfall unter Novocain kann mit seiner Membranwirkung erklärt werden. Nach Fleckenstein (1955) verdichtet und stabilisiert das Novocain die erregbare Membran und erschwert damit die für den Erregungsablauf notwendige Depolarisation. Aus experimentellen Befunden folgerte man dann eine Identität von Novocain- und Anodenblock, die zur Bezeichnug der „Anelektrotonica" veranlaßte. Man übertrug ferner die dem Anelektrotonus zukommende restitutive Komponente auf die „Anelektrotonica" und rechnet zu ihrer Grundwirkung neben der Membrandichtung auch die Repolarisation (Eichholtz 1950; Fleckenstein 1955). Nach den eigenen Ergebnissen hemmt aber das Novocain die restitutive Repolarisation, gemessen als absolute Refraktärzeit in dem gleichen Maße, in dem es die Erregungsleitung verlangsamt. Dies steht unseres Erachtens nicht im Widerspruch zu der Annahme einer membrandichtenden Grundwirkung, die sowohl dem passiven Ionentransport während der Erregung als auch den aktiven in der Repolarisationsphase erschwert. Die Sonderstellung des Novocains zeigt sich auch mit der Tatsache, daß es die Leitung in dem ganzen theoretisch möglichen Ausmaß senken kann; so konnten wir eine Abnahme um 95% messen, während die Erregungsleitung mit den übrigen Substanzen höchstens um 70% herabgedrückt werden kann und bei weiterer Substanzeinwirkung erlischt.

Für die der Wirkungsweise des Chinidins entsprechenden Stoffe, zu denen auch das Novocainamid gehört, müssen tiefere Angriffspunkte angenommen werden. Grundsätzlich wird es sich um eine für das Chinidin charakteristische Stoffwechselreduktion handeln, wobei die spezielle Lokalisation im Zellstoffwechsel unbekannt ist. Damit soll die Annahme einer zusätzlichen Membranwirkung nicht ausgeschlossen werden, denn nach Jacobi u. Malorny (1952) besitzt neben dem Novocain auch das Chinin Schutzeffekte gegen Depolarisation des Muskels, und nach Frédericq (1955) scheint der Mechanismus der inotropen und chronotropen Chinidinwirkung nicht identisch zu sein.

Tabelle 5. *Verhältnis zwischen prozentualer Änderung der absoluten Refraktärzeit und der Erregungsleitungsgeschwindigkeit*

Substanz	Refr. Zunahme / LG-Abnahme	Kontraktions-Abnahme in Prozent
Ajmalin $5 \cdot 10^{-6}$	1,6	28
Serpentin 10^{-5}	1,5	0
Novocainamid $5 \cdot 10^{-5}$	1,2	13
Chinidin 10^{-5}	1,0	0
α-Fagarin $5 \cdot 10^{-6}$	0,8	0
Chinin 10^{-5}	0,7	0
Novocain $5 \cdot 10^{-5}$	0,6	30

Zur Beurteilung der flimmerwidrigen Wirksamkeit eines Stoffes ist der Quotient aus Refraktärzeitzunahme und Leitungsabnahme von Interesse. In Tab. 5 ist dieses Verhältnis aus den prozentualen Änderungen

beider Meßgrößen für die Konzentrationen berechnet, welche die Kontraktionsfähigkeit nicht wesentlich beeinträchtigen.

Demnach erscheinen die Rauwolfia-Alkaloide Ajmalin und Serpentin am günstigsten, für sie ergeben sich die höchsten Quotienten. Es folgen Novocainamid und Chinidin, während für das α-Fagarin, Chinin und Novocain eine negative Auslese zu treffen wäre. Diese Rangordnung kann jedoch nicht auf den Wirkungswert der Stoffe im praktischen Fall des Herzflimmerns übertragen werden, dafür ist der Vorgang zu komplex und seine Unterdrückung gewiß Ergebnis mehrerer Faktoren. So ist von Lewis u. Drury (1926) der Begriff der „effective refractory period" eingeführt. Danach ist die Erholungszeit entscheidend, die der Muskel nach einer Kontraktion braucht, um eine erneute leitungsfähige Kontraktion auszubilden. Dipalma (1955) macht auf das Phänomen der Latenzzeit aufmerksam, die sich prinzipiell von der Refraktärzeit unterscheidet, an diese nicht gekoppelt zu sein braucht und sogar gegenläufig sein kann. So ist im Mechanismus der Flimmerunterbrechung nicht nur die Verlängerung der Refraktärzeit, sondern auch die der Latenzzeit zu diskutieren. Aber auch bei Berücksichtigung dieser Kriterien kommt der absoluten Refraktärzeit des Aktionsstromes eine grundlegende Bedeutung zu, denn die Erzeugung eines normalen Aktionsstromes ist schließlich primäre Voraussetzung der Erregung und kann bei Hemmung durchaus limitierender Faktor für alle weiteren Teile des Erregungsvorganges sein. Entsprechendes gilt für die Fortleitungsgeschwindigkeit des Aktionsstromes, deren Abnahme ein exaktes Maß ist für den zunehmenden zeitlichen Abstand der Erregungsfront von dem von ihr liegenden Erregungsende.

Auch ein Vergleich mit den Substanzwirkungen bei experimentell erzeugtem Flimmern des Froschherzens ist nicht möglich, weil dem als Flimmern bezeichneten Phänomen in Abhängigkeit von den jeweiligen experimentellen Maßnahmen verschiedene Grundvorgänge zugrunde liegen. Das durch Aconitin, Veratrin und Bariumchlorid hervorgerufene „Flimmern" des Froschherzens ist nach unseren Befunden nichts anderes als ein resultierender Erregungsvorgang nach frequenter heterotoper Reizung, die in diesem Fall durch Spontanentladung eines sehr eng begrenzten Gewebsbezirkes ausgelöst wird. Demgegenüber wird mit der häufig angewandten Messung der elektrischen Flimmerschwelle unter Einfluß antifibrillär wirksamer Substanzen ebenfalls nicht die spezifische Flimmerwidrigkeit erfaßt, sondern lediglich ihr Einfluß auf die Erregbarkeit.

Zusammenfassung

Refraktärzeit und Leitungsgeschwindigkeit wurden am Herzmuskelpräparat des Frosches für folgende Substanzen bestimmt: Chinin-Sulf., Chinidin-Sulf., α-Fagarin, Novocain (Procain), Novocainamid (Procainamid), Ajmalin und Serpentin.

Alle Substanzen verlängern die Refraktärzeit, senken dabei aber auch gleichzeitig die Leitungsgeschwindigkeit; am stärksten wirksam ist das

Rauwolfia-Alkaloid Ajmalin. Die Größe des Zahlenverhältnisses von Refraktärzeitzunahme und Leitungsabnahme ist ein Maß für die antifibrilläre Wirksamkeit; nach Berechnung dieser Quotienten ergibt sich für die untersuchten Substanzen die Reihenfolge: Ajmalin > Serpentin > Novocainamid > Chinidin > α-Fagarin > Chinin > Novocain.

Mit Ausnahme des Novocains gleicht der Wirkungsmechanismus aller Substanzen dem des Chinidins, kennzeichnend dafür ist: langsamer Wirkungseintritt und fehlende Auswaschbarkeit. Angriffspunkt dieser Stoffe scheint der Zellstoffwechsel zu sein.

Demgegenüber setzen die Effekte des Novocains schlagartig ein und sind völlig reversibel, so daß für das Novocain eine ausschließliche Membranwirkung angenommen werden kann.

Literatur

Alles, G. A., and C. H. Ellis: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **94**, 416 (1948). — Bammer, H., u. K. E. Rothschuh: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 367 (1952). — Benthe, H. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 285 (1954) und Z. Biol. **108**, 241 (1956). — Boros, F. v.: Ther. Gegenw. **1951**, 179. — Brown, B. B., and G. H. Acheson: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **102**, 200 (1951). — Dawes, G. S.: Pharmacol. Rev. **4**, 43 (1952). — Deulofen, V., R. Labriola, O. Orias, E. Moisset de Espanes and A. C. Tacquini: Science (Lancaster, Pa.) **102**, 69 (1945). — Deulofen, V., e J. Comin: Il Farmaco **6**, 340 (1954). — DiPalma, J. R.: Amer. J. Physiol. **180**, 96 (1955). — DiPalma, J. R., and A. V. Mascatello: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **101**, 243 (1951). — van Dongen, K.: Arch. internat. Pharmacodynamie **53**, 80 (1936); **93**, 148 (1953). — Eichholtz, F.: Klin. Wschr. **1950**, 761. — Fleckenstein, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch Bln. 1955. — Fredericq, H.: Arch. internat. Physiol. **63**, 181 (1955). — Hazard, R.: La Novocain et ses actions pharmacodynamiques. Paris 1948. — Hartog, E.: Arch. internat. Pharmacodynamie **51**, 10 (1935). — Jacobi, G., u. G. Malorny: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 185 (1952). — Lewis, Th., A. N. Druvy, C. C. Iliescu and A. M. Wedd: Heart **9**, 55 (1921). — Lewis, Th., and A. N. Druvy: Heart **13**, 96 (1926). — Mark, L. C., H. I. Kayden, J. M. Steele, J. R. Cooper, I. Berlin, E. A. Rovenstino and B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **102**, 5 (1951). — Moisset de Espanes, E.: Rev. Soc. argent. Biol. **13**, 259 (1937). — Szekely, P., and N. A. Wynne: Brit. Heart J. **16**, 267 (1954) — Tacquini, A. C.: Heart **33**, 719 (1947). — Tripod, J.: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 121 (1951). — Schaefer, H.: Das EKG in Theorie u. Klinik, Bln. 1951. — Wedd, A. M., and H. A. Blair: Anesthesiology **12**, 261 (1951). — Wendhut, G., u. L. Lendle: Z. exper. Med. **118**, 91 (1951). — Woske, H., J. Belford, F. N. Fastier and M. Brooks: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 134 (1953). — Scherf, D: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **67**, 59 (1948).

Dr. H. F. Benthe, Kiel, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 92—100 (1956)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg/Br.
(Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer)

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kobaltwirkung auf den Eisenstoffwechsel (Speichereisen)

Von
Friedrich Wöhler und Dieter Emrich

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Mai 1956)

Seit Pitini u. Messina 1899 die erythro- und hämoglobinopoetische Wirkung von Kobalt entdeckten, wurden Beziehungen zum Eisenstoffwechsel vermutet. Erste tierexperimentelle Untersuchungen zur Klärung dieser Frage führte Kato durch. Sie bestätigten, daß unter Kobaltapplikation tatsächlich ein vermehrter Eisenbedarf vorhanden ist. Eine Speicherung von in großen Dosen oral zugeführtem Eisen blieb in der Milz aus. Auch die Verminderung des Serumeisengehaltes bei Beginn der durch Kobalt hervorgerufenen Hämopoese trat unter Eisenzufuhr nicht ein. Eine Beobachtung, die auch durch die klinischen Ergebnisse von Weissbecker, Goldeck, Wolff, Wintrobe u. a. bestätigt werden konnte.

Bei intravenöser Gabe von hohen Kobaltdosen beobachteten Weissbecker und auch Goldeck einen erheblichen Anstieg des Serumeisens. Dieser Befund wurde im Sinne einer Eisenverwertungsstörung gedeutet. Eine Auffassung, die durch die tierexperimentellen Untersuchungen von Weissbecker ihre Bestätigung fand, da bei sehr hohen intramuskulären Kobaltdosen eine maximale Eisenanreicherung in der Milz des Meerschweinchens eintrat.

Über den Wirkungsmechanismus des Kobalts auf den Eisenstoffwechsel bestehen noch keine gesicherten Vorstellungen. Von Staffe u. Darguzas wird es für möglich gehalten, daß durch Kobalt Eisen aus der Katalase freigesetzt wird, um zur Hämoglobinsynthese zur Verfügung zu stehen. Weissbecker bezweifelt jedoch aus quantitativen Überlegungen heraus, ob die vorhandene Menge Katalaseeisen ausreichen würde, um den Anstieg des Hämoglobins zu erklären. Wahrscheinlich ist aber nach diesem Autor das Kobalt in der Lage, Eisen aus seinen Eiweißbindungen zu verdrängen und freizusetzen, wie es von Lieben u. Jesserer am Eiweißmodell gezeigt wurde.

Nachdem es durch die Methodik der exakten quantitativen Ferritineisenbestimmung und indirekten Hämosiderineisenbestimmung möglich geworden ist, einen tieferen Einblick in das Eisenstoffwechselgeschehen zu gewinnen, erschien es von Interesse, zu versuchen, die Kobaltwirkung auf den Eisenstoffwechsel noch näher zu definieren. Es wurden daher vergleichende Untersuchungen bei oraler Eisenzufuhr, unter Kobalt und Kobalt-Eisengabe durchgeführt.

I. Material und Methodik

Zur Untersuchung verwendeten wir etwa 60 Meerschweinchen aus einem gesunden Inzuchtstamm mit einem Durchschnittsgewicht von etwa 400 g. Die Versuchstiere erhielten während der etwa 4monatigen Quarantäne und während der Versuchsdauer eine einheitliche Ernährung aus Rüben und Grünfutter. Für Toxicitätsversuche kamen Albinoratten aus einem gesunden Inzuchtstamm zur Verwendung. Diese Tiere erhielten Körner und Brot.

Ferrosulfat (DAB 6) wurde in der Dosierung von 100 mg entsprechend etwa 33 mg Fe-II-Ionen pro Kilogramm den Versuchsgruppen 6 bzw. 14tägig durch die Schlundsonde verabreicht.

Kobalt-II-chlorid wurde nach Lösung in Aqua bidest. i.m. so appliziert, daß die Tiere jeweils 0,1, 0,25, 0,5, 3,0, 6,0, 12,0 u. 18,0 mg Kobalt-II-Ionen pro Kilogramm täglich für die entsprechende Versuchsdauer erhielten.

Die quantitative Ferritineisenbestimmung wurde in einer Modifikation der früher von Keiderling u. Wöhler beschriebenen Methode der Ferritinbestimmung so durchgeführt, daß nach Homogenisierung des Organgewebes das Homogenat 2 Std bei Zimmertemperatur stehen blieb und dann sehr langsam bis 80° C erwärmt wurde, wobei die Masse der Proteine ausfiel. Nach Abkühlung wurde 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend Filtration (Filter Sch. & Sch. 589³) des Überstandes. Im Exsiccator über H_2SO_4 Einengung bis zur Trockne. Dann wurde wie früher beschrieben verfahren. Diese Modifikation der Ferritinbestimmungsmethode wurde gewählt, um bei dem teilweise doch sehr geringen Ausgangsmaterial eine exakte Ferritineisenbestimmung zu ermöglichen. Eine genaue Apoferritinbestimmung ist allerdings bei dieser Art der Aufarbeitung nicht mehr möglich, da die noch reichlich vorhandenen anderen Zelleiweiße das Apoferritin im Elektrophoresestreifen überlagern. Für die vorgesehenen Eisenstoffwechseluntersuchungen war jedoch der Ferritineisengehalt von besonderer Bedeutung, so daß eine Vernachlässigung der Apoferritinbestimmung in Kauf genommen werden konnte. Andererseits weist der Ferritineisengehalt keine großen Schwankungen auf, so daß bei einem Durchschnittseisengehalt von etwa 23% des Ferritins gute Rückschlüsse auf den eigentlichen Ferritingehalt der untersuchten Organe möglich sind.

Die Bestimmung des gesamten Organeisens erfolgte nach feuchter Veraschung (A. Neumann) quantitativ chemisch nach L. Heilmeyer u. K. Plötner.

Der Hämosiderineisengehalt der Organe wurde durch Subtraktion des Ferritineisens und des Hämoglobineisens bei Vernachlässigung der Fermenteisenfraktion erhalten. Die Ermittlung des Hämoglobineisens erfolgte indirekt durch elektrophoretische Abtrennung des Hämoglobins von Zellproteinen der jeweiligen Organe und rechnerischer Bestimmung des Eisenanteils in Hämoglobin nach einer noch unveröffentlichten Methode von F. Wöhler.

Die Zählung der Erythrocyten wurde in einer Zählkammer nach Neubauer unter Verwendung geeichter Pipetten vorgenommen. Die Hämoglobinbestimmung erfolgte in einem geeichten Hämometer nach Sahli mittels geeichter Pipetten. (Einer Verwendung des Zeiß Ikon-Hämometers stand die Schwierigkeit gegenüber

bei den Meerschweinchen jederzeit genug Blut aus den Gefäßen der Ohren zu gewinnen.) Die Zählung der Erythrocyten und die Bestimmung des Hämoglobingehaltes erfolgte vor Versuchsbeginn, nach 5, 10 u. 15 Tagen.

Histologische Untersuchungen. Da nach den Untersuchungen von T. Hirasawa u. F. Kinoshita mit Radiokobalt dieses in der Leber am stärksten aufgenommen wird und dieses Organ eine besondere Empfindlichkeit hinsichtlich toxischer Schwermetallwirkung zeigt, untersuchten wir von jeder Versuchsgruppe die Leber feingeweblich. Vergleichend kamen auch die Organe von Normaltieren zur feingeweblichen Beurteilung. Es wurden Hämatoxilin-Eosin-, Kresylviolettfärbungen und eine Fettdarstellung mittels SudanIII durchgeführt. Außerdem erfolgte eine histochemische Eisendarstellung vermittels der Turnbullblau-Reaktion nach Tirmann u. Schmeltzer in der Modifikation von Hueck.

II. Ergebnisse

Normaltiere. Um vergleichbare Ausgangswerte zu erhalten, wurde von 10 Meerschweinchen der Ferritineisengehalt in Leber, Milz und Darm (Duodenum und Dünndarm), sowie der Hämosiderineisengehalt in Leber und Milz bestimmt. Von einer Bestimmung des Hämosiderineisengehaltes im Darm wurde abgesehen, nachdem Vorversuche zeigten, daß selbst eine sehr sorgfältige Spülung von Magen und Darm nicht ausreichte, das oral zugeführte noch nicht resorbierte Eisen aus diesen Organen wirklich zufriedenstellend zu entfernen. Es ist wahrscheinlich, daß ein Teil dieses Eisens in den Drüsenschläuchen des Magens bzw. in den Schleimhautfalten des Darmes liegen bleibt und dadurch den Organeisengehalt verfälscht.

Die erhaltenen Werte des Ferritineisens und Hämosiderineisens wurden statistisch gesichert.

Ergebnisse bei oraler Eisenzufuhr. Wie die Abb. 1 und 2 zeigt, kam es in Abhängigkeit von der Dauer des oral zugeführten Ferrosulfates zu einem Anwachsen vor allem der Ferritineisenfraktion in der Leber, weniger ausgeprägt in der Milz. Die Hämosiderineisenfraktion zeigte in Leber und Milz nur eine geringe Zunahme. Dieser Befund entsprach den bekannten Untersuchungsergebnissen, daß durch eine orale Eisenzufuhr, wenn sie nicht zu Verätzungen der Darmschleimhaut führt, keine Hämosiderose entsteht. Das Ferritineisen wies jedoch entsprechend der Absättigung des Organismus mit Eisen einen sehr hohen Wert auf.

Die Bestimmung des Ferritineisengehaltes im Darm (Duodenum und Dünndarm) ergab nach 6 Tagen einen sehr starken Anstieg, wie es in Abb. 3 zur Darstellung kommt. Nach 14 Tagen war der Ferritineisengehalt des Darmes noch immer signifikant erhöht, wies jedoch eine leichte Verminderung auf. Trotz des vermehrten oralen Eisenangebotes war also eine Abnahme des Darmferritins eingetreten.

Kontrolluntersuchungen des roten Blutbildes ergaben in diesen Versuchsgruppen keine signifikanten Veränderungen. — Histologisch waren keine Abweichungen von der Norm nachweisbar.

Versuche mit Kobalt. Vorversuche mit intramuskulärer Injektion von Kobaltchlorid ließen erkennen, daß bei einer täglichen Dosis von 0,1—0,25 mg Kobalt-II-Ionen keine wesentlichen Veränderungen im

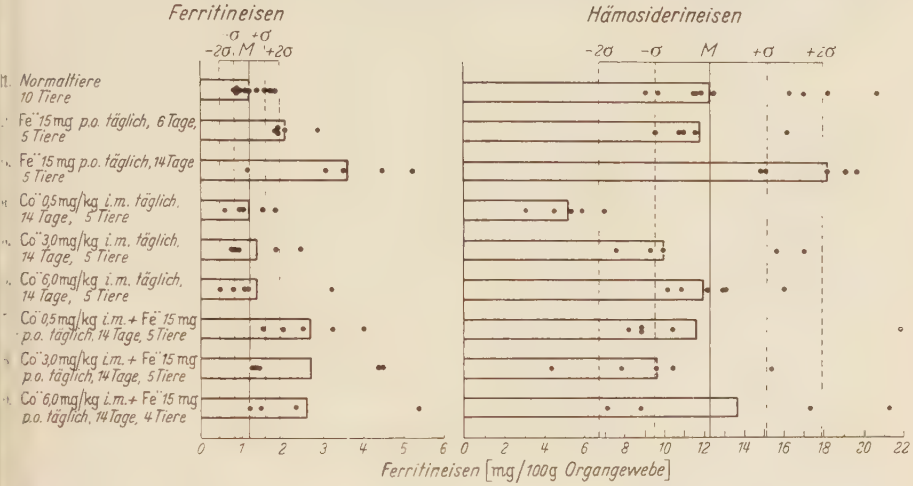


Abb. 1. Ferritin- und Hämosiderineisengehalt der Meerschweinchenleber unter Eisenzufuhr, Gabe von Kobalt und Kobalt-Eisen

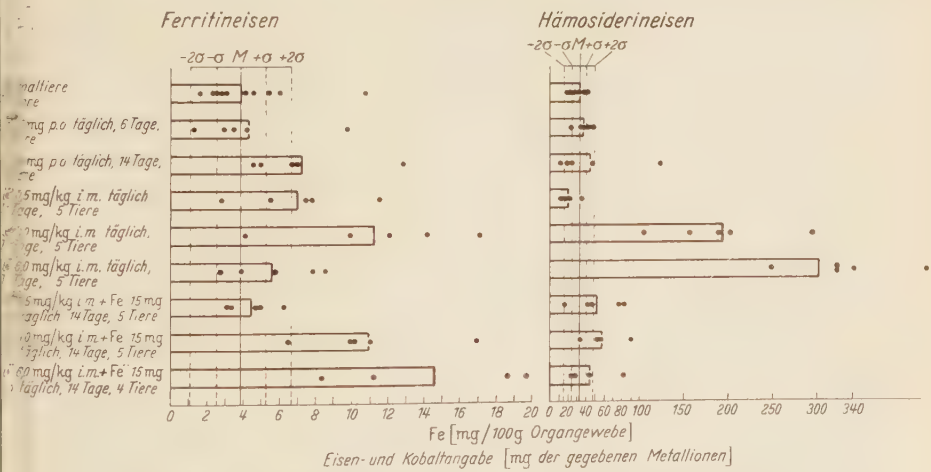


Abb. 2. Ferritineisen- und Hämosiderineisengehalt der Meerschweinchenmilz unter Eisenzufuhr, Gabe von Kobalt und Kobalt-Eisen

roten Blutbild auftraten. Für die Versuchsgruppen wurden daher Dosen gewählt, die 0,5, 3,0 und 6,0 mg Kobalt-II-Ionen entsprachen. Wie die Abbildungen zeigen, kam es nach Gabe von 0,5 mg Kobalt-II-Ionen in der Leber zu keiner wesentlichen Veränderung der Ferritineisenfraktion.

Das Hämosiderineisen war in diesem Organ jedoch signifikant vermindert. In der Milz traten nur geringe Verschiebungen der Speichereisenfraktionen ein. Der Ferritineisengehalt des Darmes zeigte keine Veränderung. Allerdings kamen nur von 2 Tieren Duodenum und Dünndarm zur Untersuchung.

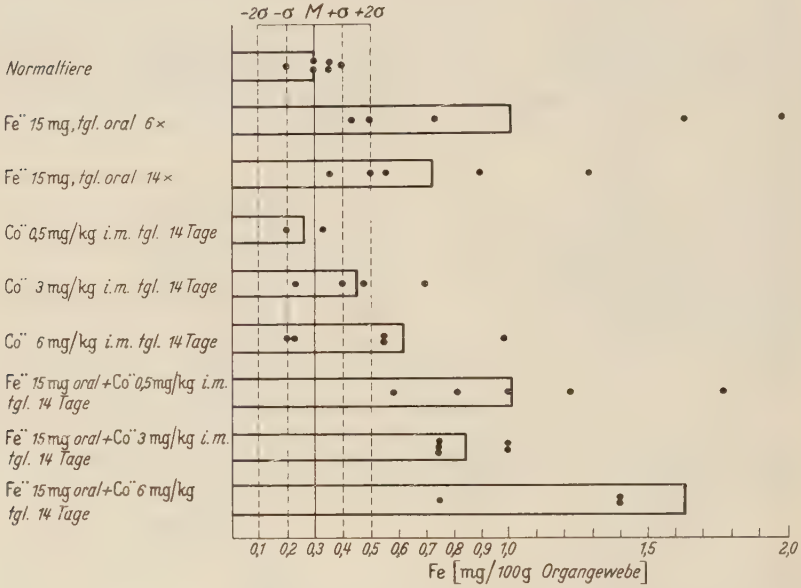


Abb. 3. Ferritineisen-Gehalt im Duodenum und Dünndarm des Meerschweinchens unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

Die histologische Untersuchung erbrachte einen normalen Organbefund.

Wie die graphische Darstellung in Abb. 4 erkennen läßt, kam es bei dieser Dosierung zu einem erheblichen hämopoetischen Effekt. Vor allem das Hämoglobin wies einen starken Anstieg auf.

Unter Gabe von 3,0 und 6,0 mg Kobalt-II-Ionen pro Kilogramm über 14 Tage kam es in der Leber zu unwesentlichen Veränderungen der Ferritin- und Hämosiderineisenfraktionen. In der Milz hingegen überraschte die außerordentlich starke Zunahme des Hämosiderineisens in Abhängigkeit von der Dosierung. Das Ferritineisen war bei 3 mg Kobalt-II-Ionen signifikant erhöht, bei 6 mg fand sich gegenüber dem Normalwert noch eine leichte Zunahme.

Das Ferritineisen des Darmes zeigte entsprechend der Dosissteigerung von Kobalt eine Zunahme an.

Auch in diesen Gruppen war ein eindeutiger hämopoetischer Effekt als Kobaltfolge nachzuweisen. Die Erythrocyten stiegen in der angegebenen

Versuchsdauer im Durchschnitt um etwa 0,8 Mill./cm³ Zellen an. Das Verhalten des Hämoglobins entsprach der Vermehrung der Erythrocyten.

Die histologische Untersuchung der Leber ergab unter der niedrigeren Dosierung Zeichen einer feinblasigen Entartung der Leberzellen. — Bei 6 mg Kobalt-II-Ionen täglich über 14 Tage wurden die Leberepithelien arm an RNS-Schollen gefunden. Eine diffuse fleckförmig betonte fein- bis mitteltropfige Verfettung war nachweisbar.

Versuche mit Kobalt bei gleichzeitiger Eisenzufuhr. Bei oraler Verabreichung von Ferrosulfat zu den aufgeführten drei verschiedenen Versuchsgruppen mit Kobalt allein wurde in der Leber ein signifikanter Anstieg des Ferritineisens in den einzelnen Gruppen beobachtet. Das Leber-Hämosiderineisen wurde etwa im Normalbereich gefunden. Auch in der Milz trat eine erhebliche Zunahme des Ferritineisengehaltes ein. Besonders deutlich wurde dies unter der hohen Dosierung. Das Hämosiderineisen wies nur eine geringe Zunahme auf. Die Werte des Ferritineisens im Darm waren in allen drei Versuchsgruppen sehr gesteigert.

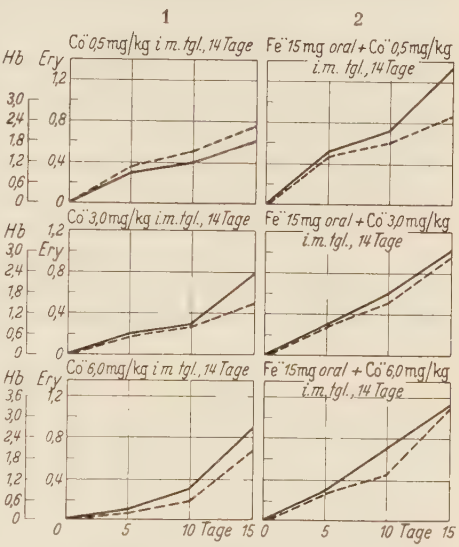


Abb. 4. Verhalten der Erythrocyten und des Hämoglobins unter Kobalt- sowie Kobalteisengaben beim Meerschweinchen. ---- Erythrocyten in Mill. —— Hämoglobin in g-%. Angabe von Eisen und Kobalt in Milligramm der gegebenen Metallionen

Der Anstieg der Erythrocyten unter Kobalt und Eisen erfolgte relativ schnell und erreichte Zunahmen der Durchschnittswerte, die über 1 Mill. Zellen/cm³ lagen. Das Verhalten des Hämoglobins lief etwa dem Erythrocytenanstieg parallel.

Histologisch wurden in der niedrigen Dosierung (0,5 mg Kobalt-II-Ionen) keine von der Norm abweichende Veränderungen in der Leber gesehen. Unter den höheren Dosierungen fanden sich in der Leber Epithelnekrosen, vor allem läppchenperipher (frische und subakute Nekrosen der Epithelzellen). Einwanderungen von Leukocyten und Rundzellen sowie Ansammlungen von Mesenchymzellen wurden beobachtet. Es bestand ein weitgehender Verlust der RNS-Schollen. In den Intermediärbezirken der Läppchen waren Verfettungen nachweisbar.

Toxicitätsversuche. Um die in den vorhergehenden Versuchen beschriebenen pathologischen Leberveränderungen in ihrem Zusammen-

hang mit den verabreichten Kobaltdosen zu sichern, wurden Toxicitätsversuche an Ratten und Meerschweinchen durchgeführt. Kobaltchlorid wurde für die Dauer von 6 Tagen in Dosen, die 6,0, 12,0 und 18,0 mg Kobalt-II-Ionen entsprachen pro Kilogramm, i.m. injiziert.

Entsprechend den früher erhobenen Befunden ließen sich bei 6 mg feintropfige Zellverfettungen nachweisen. Bei 12 mg wurden Einzelzellnekrosen und Nekrosegruppen mit Ansammlungen von Mesenchymzellen gesehen. Die Verteilung der Nekrosen war diffus in den einzelnen Läppchen. Die erhebliche mitteltropfige Verfettung war vor allem in den Läppchenintermediärbereichen nachzuweisen. Nach 18 mg fanden sich die bei 12 mg geschilderten Ergebnisse in verstärktem Ausmaße. Ein prinzipieller Unterschied zwischen den Tierarten bestand nicht. Bei diesen Versuchen war auffällig die individuelle Widerstandskraft gegenüber der toxischen Wirkung des Schwermetalls zu beobachten. So kamen einzelne Meerschweinchen und Ratten schon nach 3—5 Tagen unter Schocksymptomen kurz nach der wiederholten Injektion ad exitum.

Diskussion

Unter oraler Eisenzufuhr kam es zu einer verstärkten physiologischen Eisenaufnahme, die ihren Ausdruck einmal in der Zunahme der Ferritineisenfraktion im Darm, dann aber auch derjenigen in Leber und Milz fand. Entsprechend den Untersuchungen von Schäfer, wonach die Leber als primäres Aufnahmeorgan für über den Darm zugeführtes Eisen gelten muß, fand sich hier auch die stärkste Zunahme der Ferritineisenfraktion, in geringerem Maße war das Hämosiderin vermehrt. — Die nach 14tägiger Eisengabe gefundene Verminderung des Ferritineisens im Darm gegenüber dem 6 Tage-Wert darf wohl als Ausdruck der verlangsamten und geringeren Resorption angesprochen werden, wie sie bei Absättigung des Organismus auch zu erwarten war.

Im Gegensatz zu intravenös verabfolgtem Eisen war es also nicht zu einer Hämosiderose bzw. stärkeren Vermehrung des Hämosiderineisens gekommen. In früheren Untersuchungen mit intravenös zugeführtem Radioeisen (Wöhler) konnte gezeigt werden, daß bei ungenügender Apoferritinbereitstellung das eingebrachte Eisen in der Form des Hämosiderins so lange gespeichert wird, bis ein Aufbau zu Ferritin möglich ist. Für die mangelnde sofortige Verwertbarkeit hoher Dosen nicht oral zugeführten Eisens sprechen auch unsere an Ratten durchgeführten Untersuchungen (Keiderling, Wöhler u. Altmeyer), bei denen wir eine Abnahme des Ferritins bei Hämosiderose der Organe sahen. Auch hieraus mußte gefolgert werden, daß die Eiweißbausteine des Apoferritins zur Bindung des zugeführten Eisens in der an Eiweiß ärmeren Form des Hämosiderins verwandt werden. Es darf also die orale Eisentherapie — wenn keine pharmakodynamische Eisenwirkung erforderlich

ist — als sinnvoller als die intravenöse angesprochen werden. Allerdings müssen gute Resorptionsmöglichkeiten über den Magen-Darmkanal bestehen. Denn es ist wahrscheinlich, daß das Eisen, welches über das Ferritin in der Mucosazelle aufgenommen wird, dem Organismus zur Verwertung zeitlich viel schneller zur Verfügung steht, da es einmal in der Form des Transferrins sofort zu den Stätten des Verbrauchs gelangen kann, oder in der Depotform des Ferritins vor allem in der Leber zur Verfügung gehalten wird.

Die von uns verwandte niedrige Kobaltdosis führte zu einem deutlichen hämopoetischen Effekt, wie er durch die an anderer Stelle zitierten Autoren bekannt war. Daß tatsächlich ein echter Eisenverbrauch aus den Depots stattfand, zeigte die signifikante Verminderung des Hämosiderineisens in der Leber und etwas geringer auch in der Milz an.

Unter den höheren Dosierungen von Kobalt wurde ebenfalls ein starker hämopoetischer Effekt beobachtet, wobei die Hämoglobinzunahme etwa der Erythrocytenvermehrung entsprach. Wie aus den Untersuchungen von Weissbecker bekannt war, trat auch in unseren Versuchen eine excessive Steigerung des Hämosiderineisens in der Milz in Abhängigkeit von der Dosierung ein. Man kann vermuten, daß unter den großen Kobaltdosen Eisen aus anderen Organen in Freiheit gesetzt und in der Milz gespeichert wird.

Trotz der Hämosiderose der Milz unter den toxischen Kobaltdosen erschien die Erythropoese, aber vor allem auch die Hämoglobinsynthese nicht beeinträchtigt sondern gesteigert. Die in der Klinik beobachtete Serumeisenerhöhung bei hohen intravenösen Kobaltdosen könnte ebenfalls durch eine Freisetzung von Eisenionen aus den Organen erklärt werden.

Interessanterweise blieb die starke Zunahme der Hämosiderineisenfraktion in der Milz bei gleichzeitiger oraler Eisenzufuhr aus. Dagegen fand sich eine Zunahme des Ferritineisens in der Milz, die in Abhängigkeit von der Dosierung des Kobalts, die bei alleiniger oraler Eisenzufuhr beobachteten Werte überstieg. In der Leber lagen die Ferritineisenwerte etwas unter den Durchschnittswerten bei alleiniger Eisenzufuhr. Die Resorption, gemessen am Darmferritingehalt, erschien vergleichsweise zu den Eisenresorptionsversuchen ohne Kobalt gesteigert. Der hämopoetische Effekt trat schneller und stärker ein. Die histologischen Untersuchungen zeigten, daß auch unter Kobalt und Eisen eine Leberparenchymschädigung als Ausdruck der toxischen Schwermetallwirkung erfolgte.

Der Befund des Ausbleibens der Hämosiderose in der Milz unter Eisenzufuhr kann vielleicht so gedeutet werden, daß das zugeführte Eisen eine noch unbekannte Schutzwirkung gegenüber dem Kobalt übernimmt.

Zusammenfassung

Bei der durch Kobalt in kleiner Dosierung induzierten Hämopoese wird zuerst das körpereigene Depoteisen mobilisiert. Bei höherer Dosierung (3—6 mg Kobalt pro Kilo und Tag) erfolgte eine vermehrte

Ferritineisenbildung im Darm. Hohe, toxische Kobaltdosen führten zu einer Hämosiderose der Milz. Bei gleichzeitiger Eisengabe blieb die Milzhämosiderose aus. Histologisch wurden unter den höheren Kobaltdosen mit und ohne Eisenzufuhr Leberparenchymschäden gesehen. Durch diese Untersuchung bestätigt sich die früher von Weissbecker erhobene Forderung der Kobalttherapie mit kleinen Dosen und Zufuhr von Eisen.

Herrn Prof. Dr. Weissbecker sind wir für freundliche Anregungen bei Durchführung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Literatur

Cartwright, G. E.: The Relationship of Copper Cobalt and other Trace Elements to Haemopoesis. J. Nutrit. **3**, 11 (1955). — Creutzfeldt, W., u. W. Schmidt: Über die Wirkung von Kobaltchlorid auf den Blutzucker und die Pancreasinseln bei verschiedenen Nagetieren. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 487 (1954). — Fleichhacker, H., u. H. Dittrich: Die Bedeutung von Kobalt und seinen Verbindungen. Wien. inn. Med. **5**, 180 (1952). — Heilmeyer, L., F. Wöhler u. W. Keiderling: Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung von Ferritin in den Organen und ihre vorläufigen Ergebnisse. Acta haematol. (Basel) **12**, 154 (1954). — Heilmeyer, L.: Ferritinstudien. Dtsch. med. Wschr. **1955**, 1377. — Heilmeyer, L. gemeinsam mit F. Wöhler: Eisenstoffwechseluntersuchungen bei Hämochromatose. 5. Europ. Hämatologenkongreß 1955. — Hendrych, J., u. H. Weden: Kobalt und Nickel. Handb. exper. Pharmakolog. Bd. III, Teil 2, 1401, Berlin 1934. — Hirasawa, T., and F. Kinoshita: Experimental Studies on the Distribution of Radioactive Cobalt (Co^{60}). Nippon acta radiolog. **12**, 73 (1955). — Hopps, H. C., A. J. Stanley and A. M. Shideler: Histologic Studies with Evaluation of Toxicity of Cobaltchlorid. Amer. J. Clin. Path. **24**, 1374 (1954). — Kato, K., and V. Job: Influence of Cobalt on Iron Transportion and Storage: A Chemical and Histologic Study. Amer. J. Clin. Path. **10**, 751 (1940). — Keiderling, W., F. Wöhler u. H. Altmeyer: Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens, II. Mitteilung: Tierexperimentelle Unters. über Ferritin- und Hämosideringehalt von Leber u. Milz unter physiolog. u. path. Beding. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 375 (1954). — Keiderling, W., u. F. Wöhler: Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens, I. Mitteilung: Eine Methode zur quant. Best. des Ferritins. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 418 (1954). — Schäfer, K. H., u. A. Breyer: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Eisenresorption im Infekt. Klin. Wschr. **1956**, 54. — Staffe, A., u. V. Darguzas: Zur Frage der Kobaltwirkung in großen Höhen. Acta haematol. (Basel) **3**, 135 (1950). — Weissbecker, L.: Kobaltwirkung am Menschen. Klin. Wschr. **1947**, 885. — Kobalt als Spurenelement und Pharmakon. Stuttgart 1950. — Die Bedeutung des Kobalts für den Eisenstoffwechsel. Arzneimittel-Forsch. **4**, 171 (1952). — Wöhler, F.: Die Bedeutung des Ferritins für die Eisenübertragung von der Mutter zum Kind. Europ. Hämatologenkongreß 1955. — Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens, III. Mitteilung: Über den intermediären Eisenstoffwechsel der Placenta. Dtsch. med. Wschr. **1955**, 30. — Tierexperimentelle Befunde zum Eisenstoffwechsel unter ACTH und Cortison. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1956, im Druck. — Wolff, H.: Kobaltwirkung auf die Hämopoese. Klin. Wschr. **1950** 279. — Grundlagen und Ergebnisse der Kobalttherapie. Med. Mschr. **4**, 239 (1951)

Dr. Friedrich Wöhler, Freiburg/Br., Med. Univ.-Klinik, Hugstetterstr. 55

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 101—112 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Zur Frage spezifisch vagal-ganglionär blockierender Wirkungen*

Von

P. Holtz und H. J. Schümann

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1956)

Die zum Nachweis ganglionär blockierender Wirkungen am häufigsten benutzte Versuchsanordnung besteht in der Registrierung der *Nickhautkontraktionen* an der narkotisierten Katze bei prä- und postganglionärer elektrischer Reizung des vom Vagus abgetrennten Halssympathicus. Von einem spezifischen Ganglienblocker erwarten wir, daß er das ggl. cervicale superius für den präganglionären Reiz undurchgängig macht, so daß dieser ohne Wirkung bleibt, während die Nickhaut sich bei *post*ganglionärer Reizung genau so stark kontrahiert wie vor der Verabfolgung des Pharmakons. Auch die *Adrenalin*wirkung auf die Nickhaut bleibt unverändert oder ist sogar wie nach chronischer Denervierung verstärkt. Ein Sympathicolyticum würde demgegenüber zur Abschwächung oder Aufhebung aller drei Wirkungen führen.

Der Nachweis einer *vagal*-ganglionär blockierenden Wirkung wäre aus anatomischen Gründen methodisch mit größeren Schwierigkeiten verknüpft, da die meisten parasympathischen Ganglien im Erfolgsorgan selbst oder ihm so nahe liegen, daß eine elektrische Stimulierung der postganglionären Nervenstrecke und damit eine Differenzierung zwischen *vagal-ganglionärer* Blockade und *parasympathicolytischer* Wirkung nicht möglich ist. Man ersetzt deshalb die postganglionäre elektrische Reizung durch die i.v. Injektion von *Acetylcholin*. Eine häufig benutzte Versuchsanordnung besteht darin, daß man den durch elektrische Reizung des Hals-Vagus und durch i.v. Injektion von Acetylcholin verursachten Blutdruckabfall vor und nach Verabfolgung des Pharmakons registriert, — und eine ganglionär-blockierende Wirkung annimmt, wenn der blutdrucksenkende Effekt der elektrischen *Vagusreizung* aufgehoben,

* Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hoff, Frankfurt a. M., zum 60. Geburtstag.

die depressorische Wirkung des *Acetylcholins* aber unbeeinflußt geblieben ist.

Ein spezifisch *vagal*-ganglionär blockierendes Pharmakon müßte im Rahmen dieser Versuchsanordnungen wenigstens innerhalb eines bestimmten Dosierungsbereiches die Wirkung der präganglionären Reizung des Halssympathicus auf die Nickhaut unbeeinflußt lassen, die blutdrucksenkende Wirkung des Vagusreizes aber — ohne Beeinträchtigung des depressorischen Acetylcholineffektes — aufheben.

Es ist verständlich, daß die Wirkungen sympathischer und parasympathischer Nerven, denen ein verschiedener Überträgermechanismus — im einen Fall ein *adrenergischer*, im anderen ein *cholinergischer* — zugrunde liegt, sich spezifisch inhibieren lassen: durch Sympathico- bzw. Parasympathicolytica. Es ist aber vielleicht von vornherein unwahrscheinlich, daß die *ganglionäre* Erregungsübertragung in sympathischen und parasympathischen Ganglien einer spezifisch-differenzierenden Blockade zugänglich ist, da der Überträgermechanismus in beiden Fällen der gleiche ist, nämlich ein *cholinergischer*.

Methodik

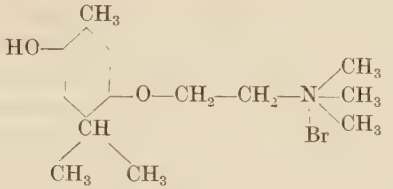
Die Versuche wurden an *Katzen* in Pernoctonnarkose (0,7—0,8 cm^3/kg der 10%igen Lösung i.m.) oder Chloralose-Urethannarkose (25 mg/kg Chloralose + 0,85 g/kg Urethan i.v.) sowie an *Hunden* in Morphin-Chloralosenarkose (2 mg/kg Morphin s.c., 80 mg/kg Chloralose i.v.) durchgeführt. — Der Blutdruck wurde mit Hg-Manometer aus der li. Art. femoralis registriert, die Injektionen erfolgten in die re. Vena femoralis. — Gereizt wurde an Katzen das periphere Ende des durchschnittenen re. Halsvagus (Blutdrucksenkung) und das zentrale Ende des vom Vagus abgelösten durchschnittenen li. Halssympathicus (Nickhautkontraktionen); an Hunden der nichtdurchschnittene re. Hals-Vago-Sympathicus (Blutdrucksenkung und Nickhautkontraktion).

Versuche

1. 6-Oxy-Thymoxy-äthyl-trimethylammonium-bromid („615")

In einer früheren Arbeit haben wir über die Pharmakologie einer Substanz aus der Reihe der Thymoxy-alkylamine berichtet: 6-Acetoxy-thymoxy-äthyldimethylamin (Opilon) (Greeff u. Schümann). Neben *sympathicolytischen* besaß die Verbindung *central sedative*, außerdem schwache *parasympathicolytische* und *Antihistaminwirkungen*. Es erschien von Interesse zu untersuchen, wie sich bei einem Stoff mit einem so breiten Wirkungsspektrum die *Quaternisierung* des Aminostickstoffes auswirkte, insbesondere, ob diese *ganglionäre* Wirkung auftreten ließe. Das der Acetoxyverbindung entsprechende Oxyderivat wurde mit Methylbromid in die quaternäre Ammoniumbase übergeführt[1].

[1] Der DIWAG, Chemische Fabriken, Berlin-Waidmannslust, danken wir für die Herstellung der Verbindung.



6-Oxy-thymoxy-äthyl-trimethylammoniumbromid („615")

Die Abb. 1 stellt einen Versuch am *Hund* dar, in dem gleichzeitig die Reaktion des Blutdrucks und der Nickhaut auf die elektrische Reizung des intakten (nichtdurchschnittenen) Hals-*Vago-Sympathicus* und die

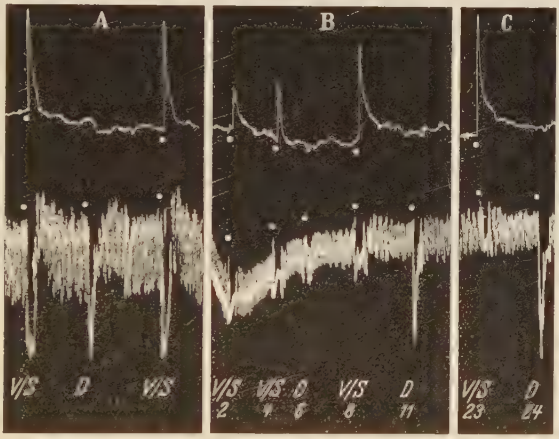


Abb. 1. „615". *Hund* 17 kg — Chloralose — Morphin. Untere Kurve: Blutdruck. Obere Kurve: Nickhaut. *V/S* Reizung des Vago-Sympathicus mit 6 Milliamp., 1 msec., 20 Hz, 5 sec. *D* 10 γ Doryl. *A*: vor, *B* und *C*: nach 2 mg/kg 615 i.v. Die Zahlen bedeuten Minuten nach der Injektion von 615

blutdrucksenkende Wirkung des *Doryls* (Carbaminoylcholin) registriert wurde. Nach der Injektion von 2 mg kg 615 ist die Wirkung der elektrischen Reizung des Sympathicus auf die Nickhaut und des Vagus auf den Blutdruck stark abgeschwächt bzw. aufgehoben; aber auch *Doryl* hat — bei der 6 min nach Verabfolgung von 615 vorgenommenen Injektion — seine depressorische Wirkung vollkommen verloren. Nach 11 und 24 min erlangt *Doryl* seine ursprüngliche Wirksamkeit wieder; auch die Hemmung der *Nickhautkontraktion* ist inzwischen abgeklungen; der *Vagusreiz* ist aber auch am Ende des Versuchs noch vollkommen unwirksam. Hätte man die Prüfung mit Acetylcholin und elektrischer Reizung erst nach 24 min vorgenommen, so wäre der Eindruck einer spezifisch vagalganglionären Blockade durch 615 entstanden.

Ähnliche Ergebnisse hatten Versuche an *Katzen*. Die Injektion von 2 mg/kg 615 ließ hier die Nickhautwirkung der elektrischen Sympathicusreizung unbeeinflußt, die blutdrucksenkende Wirkung des Acetylcholins

und des Vagusreizes war bei der nach 5 und 8 min erfolgten Prüfung fast aufgehoben. Nahm man diese nach 30 bzw. 33 min vor, so ergab sich, daß bei noch fast vollkommener Aufhebung der Vaguswirkung Acetylcholin wieder wirksam war, und deshalb die Annahme einer spezifisch vagal-ganglionären Blockade wiederum die nächstliegende Erklärung gewesen wäre.

Die schon der Grundsubstanz mit *tertiärem* Stickstoff zukommende *parasympathicolytische* Wirkung wird durch die Quaternisierung um das

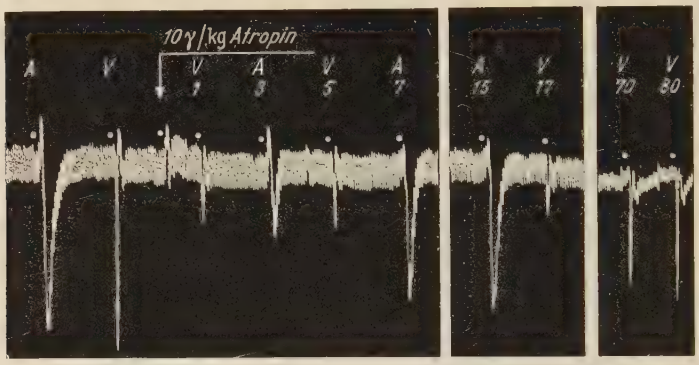


Abb. 2. *Atropin. Katze* 3,0 kg — Pernoctonnarkose — künstliche Atmung. *V* Vagusreiz mit 3 Milliamp., 1 msec, 20 Hz, 3 sec, *A* 0,4 γ Acetylcholin. Die Zahlen bedeuten Minuten nach der Injektion von Atropin

20—30fache verstärkt. Die Antiacetylcholinwirkung des 615 beträgt am Meerschweinchendarm und -vorhof ungefähr 1/200 derjenigen des Atropins.

2. Atropin

In dem Versuch der Abb. 2 an der Katze wurde anstatt 2 mg/kg 615 — wie in dem Versuch der Abb. 1 — die der parasympathicolytischen Wirksamkeit entsprechende *Atropin*dosis (1/200 = 10 γ/kg) injiziert. Die nicht abgebildeten Nickhautkontraktionen bei elektrischer Sympathicusreizung blieben erwartungsgemäß unbeeinflußt; die depressorische Wirkung sowohl des Vagusreizes als des Acetylcholins sind fast aufgehoben. Nach 7 und 15 min jedoch ist *Acetylcholin* wieder deutlich wirksam, während der *Vagusreiz* erst nach 70 und 80 min etwas von seiner anfänglichen Wirksamkeit wiedergewinnt.

Die dem 615 zukommende *atropinähnliche*, *parasympathicolytische* Wirkungskomponente könnte somit, wie Atropin selbst, eine spezifisch *vagal-ganglionäre* Wirkung vortäuschen, wenn man mit elektrischer Vagusreizung und Acetylcholin erst zu einem Zeitpunkt prüft, zu dem Acetylcholin *schon* wieder wirksam, der Vagusreiz aber *noch* aufgehoben ist.

3. 2-(p-Butoxy-phenyl)-2-(Tetrahydro-1,4-Oxazinomethyl)-Dioxalan-(1,3)-Methylbromid („Q 160")

In einer kürzlich erschienenen Arbeit berichten Kadatz u. Klupp über eine quartäre, ganglienblockierende Substanz („Q 160"), die sich durch die hohe Spezifität ihrer Wirkung auf vagale Ganglien von den bereits bekannten Ganglienblockern unterscheidet. In Versuchen an Katzen wurde die Blutdrucksenkung nach elektrischer Hals-Vagusreizung bereits durch 0,3 mg/kg i.v. für 5—10 min, durch 1 mg/kg meist für mehr als 20 min aufgehoben. Die blutdrucksenkende Wirkung

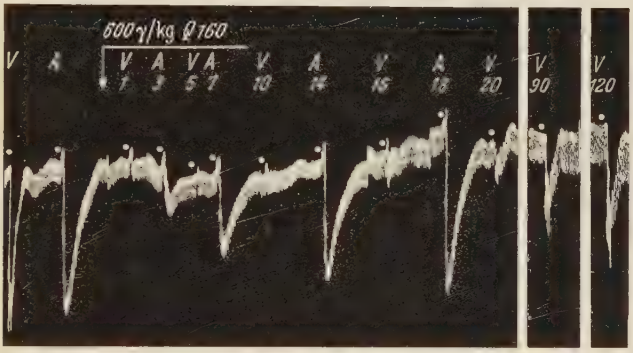


Abb. 3. „Q 160". *Katze* 3,1 kg — Pernoctonnarkose — künstliche Atmung. *V* Vagusreiz mit 3 Milliamp., 1 msec, 10 Hz, 7 sec, *A* 0,2 γ Acetylcholin. Die Zahlen bedeuten Minuten nach der Injektion von Q 160

des Acetylcholins blieb durch diese niedrigen den Vagus blockierenden Dosen unbeeinflußt. Erst bei weiterer Erhöhung der Dosis (8 mg/kg) wurden die Nickhautkontraktionen nach elektrischer Halssympathicusreizung abgeschwächt. Diese Ergebnisse würden demnach zu der auch von den Autoren gezogenen Schlußfolgerung berechtigen, daß „der Abstand zwischen den Dosen, die die *vagalen* Ganglien einerseits und die *sympathischen* Ganglien andererseits blockieren, weit genug ist, um eine gezielte Ausschaltung zu ermöglichen".

Die der Arbeit beigefügten Abbildungen geben keinen *Beleg* für die Intaktheit des depressorischen Acetylcholineffektes nach Aufhebung der blutdrucksenkenden Wirkung der elektrischen Vagusreizung, so daß nicht zu ersehen ist, in welchem *zeitlichen Abstand* von der Injektion des Q 160 die Prüfung mit Acetylcholin vorgenommen wurde. Dieser ist aber, wie unsere Versuche mit *Atropin* zeigen, von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung, ob es sich um eine „Parasympathicolyse" oder um eine „vagalganglionäre Blockade" handelt, — und wäre es im Falle des Q 160 in besonderem Maße, da dieses, wie die Autoren selbst angeben, am Meerschweinchendarm eine — parasympathicolytische · Antiacetylcholinwirkung besitzt, die nur 60mal schwächer ist als diejenige des Atropins. Da wir, wie in der Einleitung dargelegt, auch aus *prinzipiellen* Gründen die Möglichkeit einer *spezifisch vagal*-ganglionären Blockade für unwahrscheinlich halten, haben wir Q 160 zu einer vergleichenden Prüfung herangezogen[1].

In dem Versuch der Abb. 3 injizierten wir entsprechend der parasympathicolytischen Wirksamkeit, die wir in Bestätigung von

[1] Herrn Dr. Klupp, Thomae-Biberach, danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

Kadatz u. Klupp am isolierten Meerschweinchendarm als 1/60 der Atropinwirkung fanden, *Q 160* in 60fach höherer Dosierung, als im Versuch der Abb. 2 *Atropin* injiziert worden war. Die Übereinstimmung der Wirkung von 600 γ/kg *Q* 160 (Abb. 3) mit derjenigen von 10 γ/kg Atropin (Abb. 2) spricht dafür, daß es die *parasympathicolytische* Wirkung des Q 160 ist, die die Hemmungseffekte verursacht und, wie in den Versuchen mit 615, eine vagal-*ganglionäre* Wirkung vortäuschen würde, wenn man das „experimentum crucis" mit *Acetylcholin* erst zu einer Zeit machte, zu der dieses seine Wirksamkeit wieder gewonnen hat.

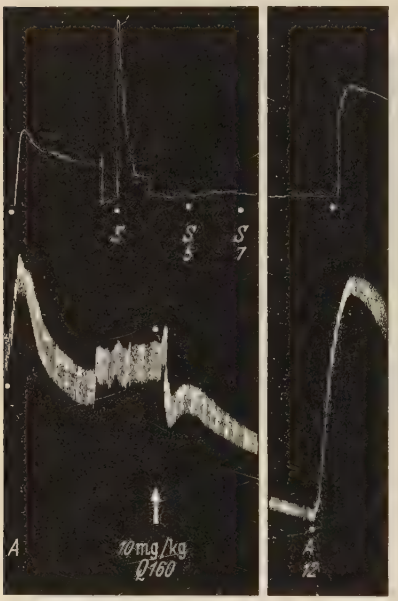


Abb. 4. „Q 160". *Katze* 3,0 kg — Pernoctonnarkose — künstliche Atmung. Untere Kurve: Blutdruck. Obere Kurve: Nickhaut. A 10 γ Adrenalin. *S* Reizung des Halssympathicus mit 3 Milliamp., 1 msec, 5 sec. Die Zahlen bedeuten Minuten nach der Injektion von Q 160

Ganglionäre Wirkungen scheinen erst bei hoher Dosierung aufzutreten, dann aber auch die *sympathischen* Ganglien zu betreffen: nach 10 mg/kg sank der Blutdruck ab, die Nickhautwirkung der elektrischen Reizung des Halssympathicus war aufgehoben und die Wirkung des *Adrenalins* auf Blutdruck und Nickhaut verstärkt (Abb. 4).

Die starke Potenzierung der Adrenalinwirkung an der Nickhaut durch Q 160 legte den Gedanken nahe, daß diese nicht nur durch eine Blockade des ggl. cervicale sup., sondern durch eine dem Präparat vielleicht zukommende *cocainähnliche, lokalanaesthetische* Wirkungskomponente verursacht sei. Q 160 erwies sich im Quaddelversuch am Menschen als ungefähr 5mal so stark anaesthesierend wie Novocain. Damit wird die Beurteilung, welcher Mechanismus der von Kadatz u. Klupp beobachteten Abschwächung des *Carotissinus-Entlastungsreflexes* und der blutdrucksteigernden Wirkung kleiner *Nicotindosen* durch hohe Dosen Q 160 zugrunde liegt, erschwert.

615 erwies sich bei höherer Dosierung an der Nickhaut weniger als Ganglienblocker, sondern als *Sympathicolyticum*. Die Wirkung der elektrischen Halssympathicusreizung war zwar aufgehoben, aber auch die *Adrenalin*wirkung auf Nickhaut und Blutdruck abgeschwächt (Abb. 5). Die Quaternisierung des Stickstoffs hat auch zum Auftreten ganglionär *erregender* Wirkungen geführt. Kleinere Dosen wirken blutdruck*steigernd*, größere verursachen *selbst* eine Kontraktion der Nickhaut (siehe Abb. 1 u. 5), und führten am Kaninchendarm zu einer Kontraktion, die sich durch Hexamethonium verhindern ließ.

4. Buscopan und Pendiomid

Die Gegenüberstellung schließlich eines weiteren Ganglienblockers, der eine stark *parasympathicolytische* Wirkungskomponente besitzt (*Buscopan*: 1-N-Butylscopolammoniumbromid[1]), mit einem solchen, dem

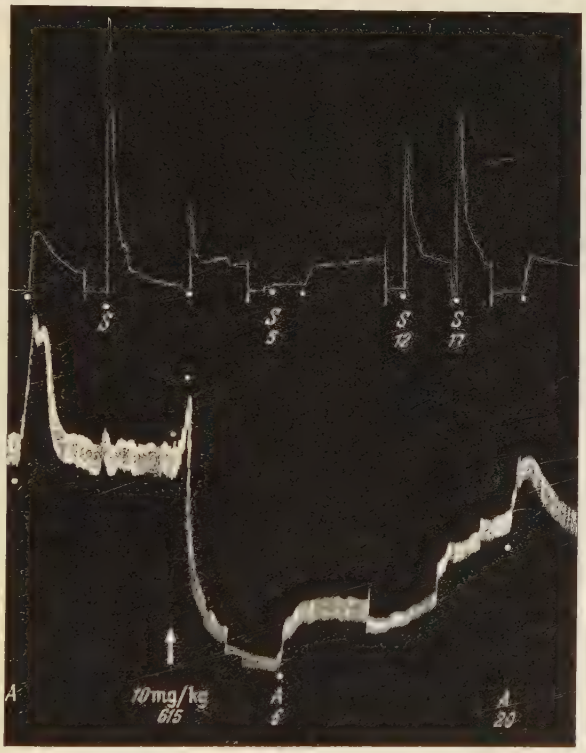


Abb. 5. „615". *Katze* 3,0 kg — Pernoctonnarkose—künstliche Atmung. Untere Kurve: Blutdruck Obere Kurve: Nickhaut. *A* 15 γ Adrenalin. *S* Reizung des Halssympathicus mit 3 Milliamp., 1 msec 20 Hz, 5sec. Die Zahlen bedeuten Minuten nach der Injektion von 615

diese fehlt (*Pendiomid*: N,N,N′,N′-3-pentamethyl-N,-N′-diäthyl-3-aza-pentylen-1,5-diammonium-dibromid[1]), zeigt vielleicht besonders deutlich, wie die atropinartige parasympathicolytische Wirksamkeit eine spezifisch *vagal-ganglionäre* Wirkung vortäuschen kann, da Atropin *selbst* das tut.

Nach *Pendiomid* (1 mg/kg) ist *sowohl* die Wirkung der Sympathicusreizung auf die Nickhaut *als auch* diejenige der Vagusreizung auf den Blutdruck abgeschwächt bei vollkommen intakter Acetylcholinwirkung (Abb. 6). Nach *Buscopan* (0,25 mg/kg) sind andererseits bei vollkommen

[1] Den Herstellerfirmen C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim, bezw. CIBA-Basel, danken wir für die Überlassung der Präparate.

intakter Sympathicuswirkung die Wirkungen des Acetylcholins und Vagusreizes aufgehoben. Eine in diesem Versuch nach 30 min vorgenommene Prüfung hätte wiederum eine spezifisch *vagal-ganglionäre* Blockade vorgetäuscht, da bei unbeeinflußtem *Sympathicus*-Effekt (Nickhaut) und wieder voller Wirksamkeit des *Acetylcholins* die elektrische *Vagus*reizung noch gänzlich unwirksam ist (Abb. 7). — Buscopan ist deshalb ebensowenig wie Q 160 ein *spezifischer Ganglienblocker*, da die atropinähnliche *parasympathicolytische* Wirkung im Vordergrund steht.

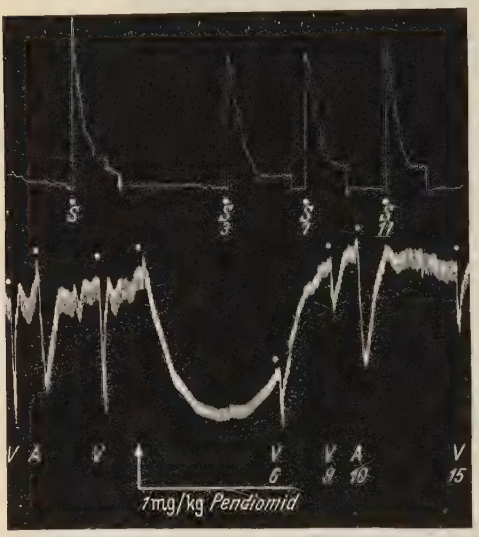


Abb. 6. *Pendiomid. Katze* 2,7 kg — Pernoctonnarkose — künstliche Atmung. Untere Kurve: Blutdruck. Obere Kurve: Nickhaut. *V* Vagusreiz mit 3 Milliamp., 1 msec, 10 Hz, 5 sec, *S* Sympathicusreiz mit 1 Milliamp., 1 msec, 0 Hz, 5 sec, *A* 0,1 γ Acetylcholin. Die Zahlen bedeuten Minuten nach der Injektion von Pendiomid

Bemerkungen

a) *Atropin* hebt schon in niedriger Dosierung (5 bis 10 γ/kg) die blutdrucksenkende Wirkung sowohl des i.v. injizierten Acetylcholins als der elektrischen Vagusreizung auf, — mit dem Unterschied jedoch, daß *Acetylcholin* schon nach wenigen Minuten, der *Vagusreiz* erst nach 1—2 Std wieder wirksam wird. Wenn auch Atropin z. B. am isoliert durchströmten ggl. cervicale sup. schon in kleinen Dosen die Erregungsübertragung hemmt (siehe z. B. Bacq u. Fredericq; Feldberg u. Vartiainen; Cahen u. Trede; Greeff u. Westermann), so ist es doch unwahrscheinlich, daß die kleinen Dosen am ganzen Tier den Vagusreiz durch eine *ganglionäre* Blockade unwirksam machen. Andererseits wäre es unbefriedigend, das verschiedene Verhalten der blutdrucksenkenden Acetylcholin- und Vaguswirkung gegenüber Atropin damit erklären zu wollen, daß das an den Nervenenden bei der elektrischen Reizung als Überträgerstoff freiwerdende Acetylcholin von der Hemmungswirkung des Atropins leichter und länger betroffen werde als das bei intravenöser Injektion von außen einwirkende, da dann für die entsprechenden Verhältnisse im Bereich des *Magen-Darmtraktes* — z. B. bei Erregung des isolierten Vagus-Magenpräparates durch elektrische Vagusreizung bzw. Acetylcholin — das Gegenteil zuträfe (Greeff u. Holtz). Die Erklärung liegt vielleicht darin, daß die bei Vagusreizung auftretende Blutdrucksenkung

hauptsächlich durch die mit starker Bradykardie einhergehende *Herzwirkung* verursacht ist, die blutdrucksenkende Acetylcholinwirkung aber wesentlich auf einer *Gefäßwirkung* beruht, so daß die Hemmung durch Atropin im einen Fall als langdauernde Wirkung ihren Angriffspunkt überwiegend am *Sinusknoten* des Herzens, im anderen Fall als flüchtigere Wirkung an den *Gefäßen* hätte.

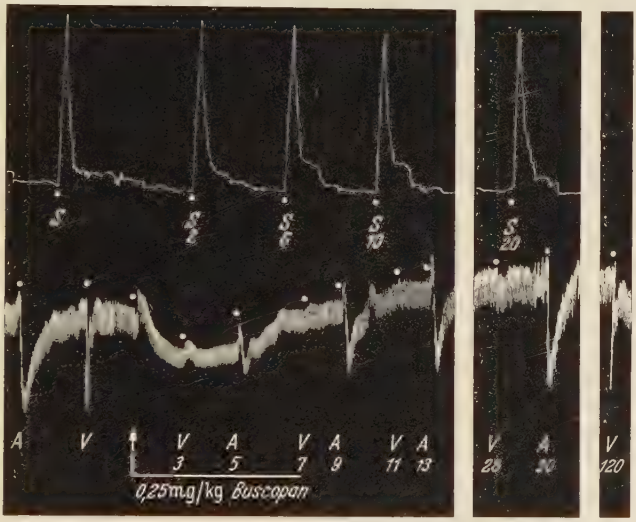
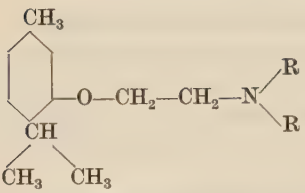


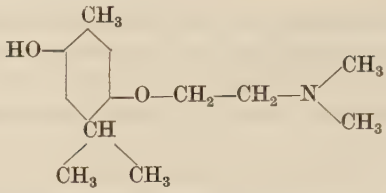
Abb. 7. *Buscopan. Katze* 2,7 kg — Pernoctonnarkose — künstliche Atmung. Untere Kurve: Blut druck. Obere Kurve: Nickhaut. *V* Vagusreiz mit 3 Milliamp., 1 msec, 10 Hz, 5 sec, *S* Sympathicus reiz mit 2 Milliamp., 1 msec, 10 Hz, 5 sec, *A* 0,1 γ Acetylcholin. Die Zahlen bedeuten Minuten nach der Injektion von Buscopan

b) Das Präparat 615 ist ein quaternisiertes *Thymoxy-alkylamin*. Zur Gruppe dieser Amine gehören u. a. das zuerst von japanischen Autoren (Anan u. Okasaki) pharmakologisch untersuchte Thymoxy-äthyl-*dimethylamin* (Tastromin), das älteste synthetische Sympathicolyticum; ferner das von Bovet u. Maderni synthetisierte und als 929 F in der Literatur bekannte Thymoxy-äthyl-*diäthylamin*, dem neben sympathicolytischen auch Antihistaminwirkungen zukommen (Bovet u. Staub), sowie das dem *Tastromin* entsprechende *6-Acetoxy*-derivat, das unter dem Namen „Opilon" wegen seiner sympathicolytischen und central-sedativen Wirkungen auch therapeutische Anwendung findet. Von dem *6-Oxy*-derivat des Tastromins leitet sich das von uns untersuchte 615 ab.

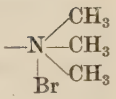
Ob die Quaternisierung des Stickstoffs zum Auftreten einer *ganglionär-blockierenden* Wirkung geführt hat, läßt sich auf Grund der mitgeteilten Versuche an Blutdruck und Nickhaut nicht sicher beurteilen, da die *adrenolytische* Wirkung eine etwa vorhandene *ganglionäre* überlagern würde. Diese die Nickhaut- und Blutdruckwirkung des Adrenalins abschwächende sympathicolytische Wirkung ist deshalb auch wesentlich an der starken *Blutdrucksenkung* nach hohen Dosen (z. B. 10 mg/kg) beteiligt. Im Gegensatz aber zu der durch Sympathicolytica leicht hemmbaren Wirkung des Adrenalins wird die durch postganglionäre elektrische Reizung des Halssympathicus ausgelöste Nickhautkontraktion viel schwerer gehemmt. In 2 Versuchen ließ sich



Thymoxy-äthyl-dimethylamin (Tastromin) R = CH_3
Thymoxy-äthyl-diäthylamin (929 F) R = C_2H_5



6-Oxy-thymoxy-äthyl-dimethylamin



6-Oxy-thymoxy-äthyl-trimethyl-ammoniumbromid (615)

zeigen, daß nach 3 und 5 mg/kg 615 die *präganglionäre* Erregung der Nickhaut abgeschwächt, die *post*ganglionäre unbeeinflußt war. — Am isolierten Meerschweinchen-*Vorhofpräparat* wurde die — atropinresistente — positiv ino- und chronotrope Wirkung des *Butyrylcholins* als nicotinartige Wirkung (Holtz u. Westermann) durch 615 ähnlich wie durch Hexamethonium und andere Ganglienblocker aufgehoben, während die sonst gleichartige Adrenalinwirkung noch unbeeinflußt blieb. Beides spricht dafür, daß 615 auch eine ganglionär-blockierende Wirkung besitzt.

Die sympathicolytische Wirkung des 615 kommt schon der Ausgangssubstanz mit *tertiärem* Stickstoff zu. Sie ist bei dieser sogar ungefähr 30mal stärker, wie die Austestung am Kaninchenuterus und an der Meerschweinchensamenblase gegen Adrenalin ergab. Während somit die *sympathicolytische* Wirkung durch die Quarternisierung *abgeschwächt* wurde, ist die ebenfalls der Grundsubstanz schon zukommende *parasympathicolytische* Wirkung fast 30fach *verstärkt* worden, wie sich bei der Testung gegen Acetylcholin am Meerschweinchendarm und -vorhof ergab. Diese schon bei niedriger Dosierung in Erscheinung tretende, im Vergleich mit Atropin ungefähr 200mal schwächere parasympathicolytische Wirkung führt wie eine 200fach kleinere Atropindosis zu einer *kurzdauernden* Aufhebung der blutdrucksenkenden Acetylcholinwirkung und zu einer *langdauernden* Aufhebung der Wirkung des elektrischen Vagusreizes. Sie täuscht deshalb, da die sympathicolytische Wirkung an der Nickhaut in diesem Dosierungsbereich noch nicht auftritt, wie Atropin *selbst* eine spezifisch vagal-ganglionäre Blockade vor.

c) Dasselbe trifft für *Q 160* und *Buscopan* zu, die zwar bei *höherer* Dosierung Ganglienblocker sind, dann aber auch die *sympathische* ganglionäre Erregungsübertragung hemmen, — bei *niedrigerer* Dosierung jedoch in gleicher Weise wie 615 wegen der auch ihnen zukommenden atropin-ähnlichen, parasympathicolytischen Wirksamkeit eine spezifische Blockierung *vagaler* Ganglien vortäuschen. Der atropinähnliche Charakter der Wirkung mußte Kadatz u. Klupp in ihren Versuchen mit Q 160 entgehen, da sie anscheinend keine Kontrollversuche mit *Atropin* machten und in den Blutdruckversuchen mit elektrischer

Vagusreizung die Prüfung mit Acetylcholin offenbar erst zu einem Zeitpunkt vornahmen, zu dem — wie nach Atropin — Acetylcholin *schon* wieder wirksam, der Vagusreiz *noch* unwirksam war.

Die starke parasympathicolytische Wirksamkeit des Q 160, die 1/60 derjenigen des Atropins beträgt und 3mal stärker ist als diejenige des 615, erklärt dann auch, daß es in den Versuchen von Kadatz u. Klupp nach Q 160 zu Tachykardie und zu einer Einschränkung der Magensaft- und Speichelsekretion kam. Sie erklärt ferner die ja sonst ganz unverständliche starke *Antinicotinwirkung* des Q 160 am isolierten Meerschweinchendarm, die von den Autoren 25mal stärker als diejenige eines spezifischen Ganglienblockers (Hexamethonium) gefunden wurde. Denn gerade am *Meerschweinchen*darm — nicht z. B. am *Kaninchen*darm — hebt ja *Atropin* die Nicotinwirkung praktisch schon in der gleichen Konzentration wie die Acetylcholinwirkung auf. Es wäre deshalb unstatthaft, aus der Antinicotinwirkung, die ein Stoff mit atropinartiger, parasympathicolytischer Wirkungskomponente am Meerschweinchendarm ausübt, auf seine ganglionär-blockierende Wirksamkeit zu schließen, — und irreführend, wollte man seine Antinicotinwirksamkeit *unter diesem Gesichtspunkt* mit derjenigen eines spezifischen Ganglienblockers vergleichen, da auch der *wirksamste Ganglienblocker* an diesem Testobjekt hinsichtlich der Antinicotinwirkung dem *Atropin* weit unterlegen ist.

Wir möchten deshalb glauben, daß Q 160 nicht, wie die Autoren annehmen, „sich durch die hohe Spezifität der Wirkung auf vagale Ganglien von den bereits bekannten Ganglienblockern unterscheidet", sondern vielmehr dadurch, daß es als *schwacher* Ganglienblocker und Lokalanaestheticum — 8—12 mg/kg sind zur Hemmung der Nickhautkontraktionen bei präganglionärer Halssympathicusreizung erforderlich — eine besonders starke atropinartige, *parasympathicolytische* Wirkungskomponente besitzt, die eine tatsächlich nicht vorhandene spezifisch vagal-*ganglionäre* Wirkung vortäuscht (siehe hierzu auch Bein, Gross, Schuler u. Tripod). Die Beimischung einer kleinen Atropindosis zu einem Ganglienblocker könnte natürlich für die erstrebte *therapeutische* Wirkung unter Umständen von Vorteil sein.

Summary

1. In cats and dogs low doses of atropine (5—10 $\mu\gamma$/kg) abolish the blood pressure lowering effect of acetylcholine and of preganglionic electrical stimulation of the vagus. The effect of acetylcholine reappears after a few minutes, whereas the effect of vagal stimulation returns only after a long interval.

2. Evidence is presented which shows that ganglion blocking agents with an atropine-like component may seem to have a specific paralysing effect on parasympathetic ganglia.

Literatur

Anan, Sh.: Fol. Pharmacol. jap. **9**, 6 (1929). — Bacq, Z., et H. Fredericq: Arch. internat. Physiol. **40**, 297 (1934). — Bein, H. J., F. Gross, W. Schuler u. J. Tripod: Schweiz. med. Wschr. **1952**, 1143. — Bovet, D,. et A. Staub: C. r.

Soc. biol. (Paris) **124**, 547 (1937). — Bovet, D., et P. Maderni: C. r. Soc. biol. (Paris) **114**, 980 (1933). — Cahen, L., et K. M. Trede: Arch. internat. Pharmacodynamie **94**, 248 (1953). — Feldberg, W., and A. Vartiainen: J. of Physiol. **83**, 103 (1935). — Greeff, K., u. H. J. Schümann: Arzneimittel-Forsch. **3**, 341 (1953). — Greeff, K., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 427, 559 (1956). — Greeff, K., E. Westermann u. G. Bohné: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 481 (1956). — Holtz, P., u. E. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 421 (1955). — Kadatz, R., u. H. Klupp: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 383 (1956). — Okasaki, T.: Jap. J. med. Sci. IV Pharmakol. **6**, 23 (1932).

Prof. Dr. P. Holtz, Frankfurt/Main, Pharmakolog. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 113—122 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über Beziehungen zwischen proteolytischer Aktivität und blutcoagulierender sowie bradykinin-freisetzender Wirkung von Schlangengiften*

Von
P. Holtz und H. W. Raudonat

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1956)

Gegen die Annahme, der Mechanismus der zur Blutgerinnung führenden Thrombinwirkung sei mit einer *proteolytischen* Wirkung verknüpft, sind zwar Einwände erhoben worden; sie findet aber darin eine Stütze, daß Proteasen, z. B. *Trypsin* und *Papain* Citratblut oder -plasma coagulieren, und daß es bei der Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen zur Abspaltung eines Polypeptides kommt (Lorand). Der Wirkungstyp der beiden eiweißspaltenden Fermente ist verschieden: *Trypsin* aktiviert in Analogie zu dem System Thrombokinase-Calcium Prothrombin zu Thrombin; *Papain* vermag *direkt* Fibrinogen in ein fibrinähnliches Coagulum umzuwandeln. Die durch Trypsin verursachte Gerinnung läßt sich durch *Heparin* verhindern, die durch Papain verursachte nicht (Eagle).

Die blutgerinnungsfördernde Wirkung der *Schlangengifte* hat man mit ihrem hohen Gehalt an Proteasen in Zusammenhang gebracht. Bei manchen Giften, z. B. von *Noteches scutatus* und *Micrurus* scheint sie hauptsächlich nach dem „Trypsin-Typ", bei anderen Giften, z. B. denen der *Bothrops-* und *Crotalus*arten nach dem „Papain-Typ" zu erfolgen (Eagle). Zu den proteasenreichsten und die Blutgerinnung besonders stark fördernden Giften gehören diejenigen der verschiedenen *Bothrops*-arten. Untersuchungen von Janszky sprechen dafür, daß auch hier die Beziehungen zwischen coagulierender und proteolytischer Wirksamkeit sehr enge sind: bei partieller Hitzeinaktivierung und anschließender Acetonfällung des Vollgiftes nahmen beide Aktivitäten in gleichem Maße ab. Der Autor nimmt deshalb an, daß proteolytische und coagulierende Wirkung an ein und dieselbe Substanz geknüpft sind.

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Die Berechtigung dieser Annahme erschien uns zweifelhaft, da wir bei den durch fraktionierte Fällung des Giftes mit Neutralsalzen erhaltenen Proteinfraktionen den Quotienten „coagulierende: proteolytische Aktivität" verschieden fanden. Wir haben versucht, die beiden Aktivitäten des Giftes zu trennen und nachzuweisen, daß die blutgerinnungsfördernde Wirkung nicht an die „proteolytische" schlechthin geknüpft sein muß.

Noch eine andere Wirkung der Schlangengifte hat man auf ihre proteolytische Wirksamkeit zurückgeführt: die Fähigkeit, aus der Globulinfraktion der Plasmaproteine das blutdrucksenkende und darmerregende „*Bradykinin*" freizusetzen (Rocha e Silva). Wir haben untersucht, ob die bradykinin-freisetzende Wirkung des Bothropsgiftes der „proteolytischen" Aktivität parallel geht.

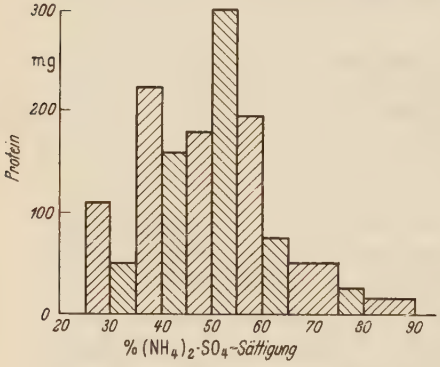


Abb. 1. Mengenmäßige Verteilung der Proteine aus 2 g Bothropsgift bei stufenweiser Fällung mit Ammonsulfat

Versuche

Nachdem Vorversuche mit stufenweiser Ammonsulfatfällung (5%ige Konzentrationssteigerung) unter Einsatz von 2 g Trockengift der *Bothrops jararaca* ergeben hatten, daß die mengenmäßige Verteilung der Proteine 3 Maxima aufweist (Abb. 1), wurde in einem mit 8 g Vollgift durchgeführten Hauptversuch bei 31, 42, 60 und 95% Ammonsulfatsättigung gefällt. Die Niederschläge wurden sulfatfrei dialysiert, durch Zentrifugieren in „Globulin"- und „Albumin"-anteil getrennt und diese gesondert lyophilisiert. Die einzelnen Proteinfraktionen wurden dann auf coagulierende und proteolytische Wirkung untersucht.

Methodik

a) Fraktionierte Fällung des Vollgiftes mit Ammonsulfat. 8 g *Bothrops*-Trockengift* wurden in 250 ml NaCl-Lösung (2,4%ig) gelöst und mit Aqua dest. auf 750 ml gebracht. Der durch Zusatz von 176,6 g $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ (31% Sättigung, p_H 5) entstehende Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, mit 5 ml 31%iger Ammonsulfatlösung gewaschen und in 100 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde aus Zellophanschlauch (*Kalle*) 48 Std gegen destilliertes Wasser im Kühlschrank sulfatfrei dialysiert, und Bodenkörper (N_1) sowie überstehende Lösung (F_1) lyophilisiert. — Die Mutterlauge der 1. Fällung wurde mit 62,7 g $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ versetzt (42% Sättigung), und der nach 16 Std abzentrifugierte Niederschlag mit 20 ml 42%iger Ammonsulfatlösung gewaschen und dialysiert. Niederschlag (N_2) und überstehende Flüssigkeit (F_2) wurden wiederum getrennt lyophilisiert. — Die

* Das Gift wurde uns in dankenswerter Weise von Herrn Prof. Slotta, São Paulo, zur Verfügung gestellt.

Mutterlauge der 2. Fällung wurde mit 102,6 g $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ auf 60% Sättigung gebracht und entsprechend weiterbehandelt (N_3, F_3). — Zur Mutterlauge der 3. Fällung wurden weitere 190 g $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ zugefügt (95% Sättigung), der Niederschlag nach 17 Std abzentrifugiert usw. (N_4, F_4). — Gesamtausbeute: 75 Gewichtsprozent (6 g).

b) Bestimmung der coagulierenden Wirkung („Papaintyp"). Hierzu wurde eine mit 12 runden Vertiefungen (20×6 mm) versehene und mit einer dünnen Schicht Silicone DC 44 (Braun, Melsungen) überzogene Plexiglasplatte verwendet, die sich in einem Wasserbad von 37° C befand. In die kreisrunden Vertiefungen wurden 0,2 ml 0,6%ige Fibrinogenlösung (Fibrinogen, Behring) in physiologischer NaCl-Lösung sowie 0,2 ml der zu untersuchenden Proteinfraktion in einer Lösung aus gleichen Teilen 0,9% NaCl + m/15 Natriumphosphatpuffer (p_H 6,8) pipettiert. — Die Zeit

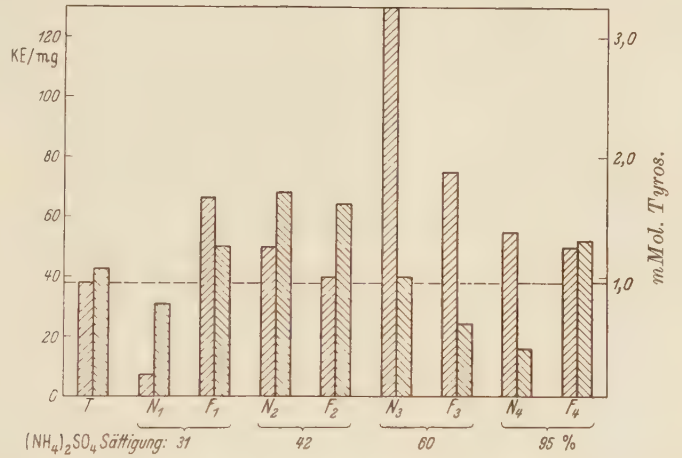


Abb. 2. Verteilung der coagulierenden und der proteolytischen Wirksamkeit auf die einzelnen Ammonsulfatfraktionen. *T* Volltoxin. *N* Niederschlag. *F* überstehende Lösung (siehe Methodik). ▒ proteolytische Aktivität in mMol Tyrosin. ▨ Koagulinwert (Koagulineinheiten (K. E.)/mg)

bis zum Auftreten eines Fibringerinnsels (Rühren mit einem Glashäkchen) wurde mit der Stoppuhr gemessen. Die zu testende Lösung war so verdünnt, daß die Koagulationszeit ungefähr 60 sec betrug.

Als „Koagulineinheit" (K.E.) wird diejenige Menge Protein bezeichnet, die bei dieser Versuchsanordnung in 60 sec die Koagulation herbeiführt; als *„Koagulinwert"* die Zahl der Einheiten pro Milligramm Protein.

c) Bestimmung der proteolytischen Wirkung. Diese erfolgte nach der Methode von Anson u. Mirsky, deren Prinzip in der colorimetrischen Bestimmung des aus *denaturiertem Hämoglobin* abgespaltenen *Tyrosins* besteht. Die proteolytische Aktivität wird in mMol Tyrosin ausgedrückt.

„Hämoglobin". 20 ml 10%ige Hämoglobinlösung (Hämoglobin, Behring) werden mit einem Gemisch aus 5 ml n/1 NaOH + 40 ml Aqua dest. + 30 g Harnstoff versetzt. Nach 30 min werden 6,5 ml n/1 $KH_2 \cdot PO_4$ zugefügt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt (p_H 7,6).

Ausführung der Bestimmung. 1 ml „Hämoglobin" wird mit 0,2 ml der auf proteolytische Wirksamkeit zu untersuchenden Lösung (1 mg Protein) 10 min bei 37° C inkubiert. Dann wird die Reaktion durch Zusatz von 2 ml Trichloressigsäure (0,3 n) gestoppt und der Niederschlag abfiltriert. 1,5 ml des Filtrats werden mit 3 ml n/2

NaOH und 0,7 ml „Phenol-Reagens" nach Folin-Ciocalteu versetzt. Die Intensität der auftretenden Blaufärbung wird nach 10 min durch Messung der Extinktion im Elko-Photometer (Zeiss) mit Filter S 72 bestimmt.

1. *Verteilung der proteolytischen und coagulierenden Aktivität auf die Proteinfraktionen N_1—N_4 und F_1—F_4*

Die Abb. 2 stellt die Verteilung der beiden Aktivitäten auf die einzelnen durch Ammonsulfatfällung erhaltenen Eiweißfraktionen dar. Die höchste „Koagulin"-Wirksamkeit mit einem Koagulinwert von 130 K.E. pro Milligramm findet sich in dem bei 60% Ammonsulfatsättigung ausgefallenen Niederschlag N_3. Diese Fraktion ist aber, wie die in Abb. 3 dargestellte gewichtsmäßige Verteilung der Proteine zeigt, der Menge nach zu gering, als daß eine weitere Aufarbeitung lohnend erschienen wäre. Hierzu wurde deshalb die zwar etwas schwächer wirksame, aber mengenmäßig größere Fraktion F_3 genommen.

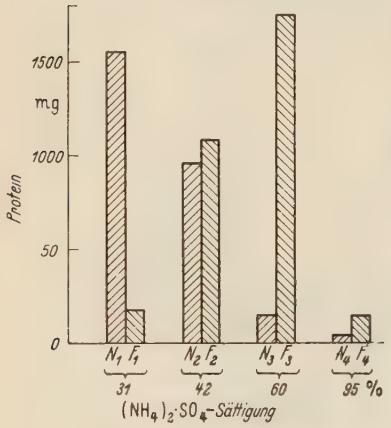


Abb. 3. Mengenmäßige Verteilung der Proteine aus 8 g Bothropstoxin. *N* Niederschlag. *F* überstehende Lösung (siehe Methodik)

„Koagulin". 500 mg der Fraktion F_3 wurden in 10 ml eisgekühlter NaCl-Lösung (0,9%) gelöst und mit 7 ml gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt (= 41% Sättigung), nachdem vorher 0,5 g Kieselgur (Merck) zugefügt worden waren, um das Abnutschen des Niederschlages zu erleichtern. Nach 3stündigem Stehen in der Kälte wurde die Fällung abgenutscht, mit etwas Ammonsulfatlösung (41% Sättigung) nachgewaschen und dann das mit der Waschflüssigkeit vereinigte Filtrat mit festem $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ auf 56% Sättigung gebracht. Nach Abzentrifugieren des entstandenen Niederschlages lieferte das Filtrat nach weiterem Zusatz von $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ bis zu 65% Sättigung die Hauptmenge an Niederschlag. Dieser wurde noch 2mal dem gleichen Fällungsverfahren unterworfen. Die vereinigten, bei 65% Ammonsulfatsättigung ausgefallenen Niederschläge wurden salzfrei dialysiert und gefriergetrocknet: *„Koagulin"*.

Die Fraktion F_3 hatte eine „Koagulin"-Wirksamkeit von 75 K.E./mg Protein (Abb. 2). Durch die oben beschriebene mehrmalige Umfällung mit Ammonsulfat kam es zu einer weiteren, fast 4fachen Anreicherung der Wirksamkeit. Diese betrug jetzt 280 K.E./mg (Abb. 4). Das p_H-Optimum der Wirkung lag zwischen 6,5 und 7,5. — Die *proteolytische* Aktivität des „Koagulins" betrug weniger als $^1/_{10}$ derjenigen des Vollgiftes (Tab. 1).

Tabelle 1. *Proteolytische und coagulierende Wirksamkeit von Vollgift, „Koagulin" und „Protesae"*

Protein	Proteolyt. Aktivität in mMol Tyrosin	Koagulinwert[1] K.E./mg
1. Vollgift	1,1	38
2. „Koagulin"	0,09	280
3. „Protease"	1,65	26

[1] Vgl. Abb. 4.

„*Protease*". Die Fraktion F_2 (Abb. 2) unterscheidet sich vom Vollgift dadurch, daß sie bei praktisch gleicher Koagulinaktivität eine um ungefähr 50% stärkere proteolytische Aktivität besitzt. Durch nochmalige Umfällung mit Ammonsulfat (42% Sättigung) war es möglich, den Koagulinwert dieser Fraktion bei unvermindert proteolytischer Wirksamkeit von 40 auf 26 K.E./mg zu senken (Tab. 1).

2. *Prothrombin-aktivierende Wirkung*

Darstellung von Prothrombin. 9 Teile frisches Rinderblut werden mit 1 Teil n/10 Natriumoxalat versetzt und zentrifugiert. Das abgeheberte Plasma wird zur Adsorption des Prothrombins mit 5 Gewichtsprozent $BaSO_4$ im Multimix bei niedriger Tourenzahl homogenisiert. Der abgenutschte Niederschlag wird mehrmals abwechselnd mit Aqua dest. und 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und dann auf je 5 g Ba SO_4 mit 20 cm³ 5%igem Na-citrat zur Lösung des Prothrombins behandelt. Diese Lösung wurde als „Prothrombinlösung" verwandt (Alexander, Goldstein u. Landwehr).

Bestimmung der prothrombin-aktivierenden Wirkung („Trypsintyp"). Hierzu wurden 2 ml der zu testenden Proteinfraktionen verschiedener Konzentration in 0,9%iger NaCl-Lösung mit 0,2 ml Prothrombinlösung bei 37° C vorinkubiert. 0,1 ml des Inkubats wurden dann zu 0,2 ml Fibrinogenlösung gegeben und die Gerinnungszeit gemessen (vgl. Methodik *b*).

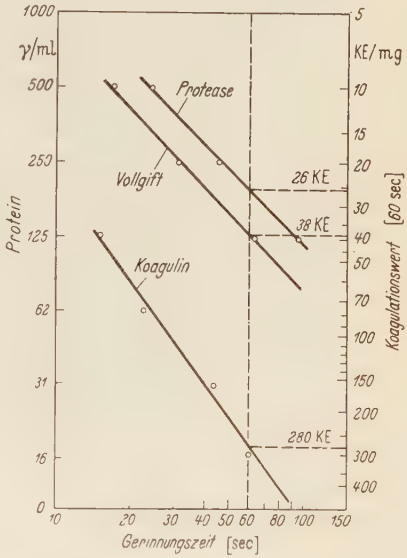


Abb. 4. Vergleich der coagulierenden Aktivität von Vollgift, „Protease" und „Koagulin". Ordinate: Giftmenge (Protein) in γ/ml (siehe Methodik)

Inkubiert man Vollgift und die beiden aus ihm gewonnenen Fraktionen „Koagulin" bzw. „Protease" mit *Prothrombin*, bevor man sie auf Fibrinogen einwirken läßt, so werden mit zunehmender Inkubationsdauer die Gerinnungszeiten für Vollgift und „Protease" immer kleiner, während sie für „Koagulin" unverändert bleiben (Tab. 2). Die prothrombin-aktivierende Wirkung haftet somit der „Protease" an. Die durch sie ausgelöste Gerinnung läßt sich im Gegensatz zur „Koagulin"-Wirkung mit *Heparin* verhindern.

In Versuchen an Kaninchen wurde die Gerinnungszeit des aus der Ohrvene entnommenen Blutes durch vorherige subcutane Injektion des Vollgiftes selbst und der aus ihm gewonnenen „Protease", nicht durch das „Koagulin" verkürzt. Heparin hob die Wirkung auf (Tab. 3). Die gerinnungsfördernde Wirkung des Schlangengiftes *in vivo* beruht demnach auf der prothrombin-aktivierenden Wirkung der „Protease".

3. Bradykininbildung

Methodik. Die in 0,9%iger NaCl-Lösung gelösten Proteinfraktionen (0,2 ml) werden mit 0,8 ml Globulinlösung (0,3 %ig in NaCl 0,9%) — aus Rinderserum durch ½-Sättigung mit Ammonsulfat gewonnen — bei Zimmertemperatur inkubiert, und die Inkubate am isolierten *Meerschweinchenileum* auf darmerregende Wirkung untersucht. — Das Darmstück war in 20 cm³ Tyrodelösung, die 10^{-7} Atropin enthielt, bei 37° C suspendiert und wurde vor Beginn der Testung durch wiederholte

Tabelle 2. *Prothrombin-aktivierende Wirkung*

1. *Vorinkubation* von 2 ml Vollgift (10 γ), „Protease" (10 γ) und „Koagulin" (2,0 γ) bei 37° C mit je 0,2 ml Prothrombinlösung („Inkubat").

2. *Gerinnungsansatz* 0,2 ml Fibrinogenlösung (0,6%ig) + 0,1 ml „Inkubat"

Inkubationsdauer in Minuten	Gerinnungszeit in Minuten		
	Vollgift	„Protease"	„Koagulin"
6	17	17	17
15	14	13	18
45	10	10	17
75	5	5	19

Tabelle 3. *Beeinflussung der Gerinnungszeit in vivo*

Kaninchen von etwa 3 kg Körpergewicht. — Bestimmung der Gerinnungszeit nach Bürker: 0,1 ml Ohrvenenblut + 0,1 ml Aqua dest., 37° C. — Gerinnungszeit in Sekunden

Kaninchen	vor der Injektion sec	60 min nach subcutaner Injektion von 3 γ/kg sec	30 min nach anschließender Injektion von Heparin (100 IE/kg Vetren) sec
1.	83	—	319
2.	116	—	333
3.	80	Vollgift 41	328
4.	110	„ 67	—
5.	82	Protease 38	315
6.	110	„ 64	180
7.	97	„ 53	162
8.	76	Koagulin 75	200
9.	66	„ 75	208
10.	77	„ 79	338

Zugabe von Bothrops-Vollgift (0,1—1 mg) „desensibilisiert", bis erneute Toxingabe keine Darmkontraktion mehr hervorrief. Unter „Bradykininbildung" wird lediglich die unter diesen Versuchsbedingungen erfolgende Bildung eines Stoffes verstanden, der eine atropinresistente Darmerregung hervorruft.

Versuchsansätze. 0,8 ml Globulinlösung + 0,2 ml Vollgift (50 γ) bzw. „Protease" (100 γ) bzw. „Koagulin" (10 und 50 γ). — Injektion von je 0,2 ml entsprechend 10 γ Vollgift, 20 γ „Protease", 2 bzw. 10 γ „Koagulin".

Die Abb. 5 zeigt, daß die bradykininbildende Wirkung unter diesen Bedingungen (ungepufferte Globulinlösung, p_H 6,8) nicht der „Protease"-,

sondern der proteolytisch nur wenig wirksamen „Koagulin"-Fraktion des Giftes zukommt: um eine gleichstarke Darmkontraktion hervorzurufen, ist von der „Protease" eine 10fach höhere Dosis (20 γ) erforderlich als vom „Koagulin" (2 γ). Die im Vergleich mit der „Koagulinfraktion" 10mal schwächere bradykininfreisetzende Wirkung der „Protease" entspricht ihrem 10mal niedrigeren Koagulinwert (vgl. Tab. 1). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß in diesem Versuch (p_H 6,8) die bradykininbildende Wirksamkeit der „Protease" auf dem ihr noch anhaftenden „Koagulin" beruht.

Aber auch die „Protease" selbst scheint, unabhängig von dem ihr in kleinen Mengen noch anhaftendem „Koagulin", einen darmerregenden

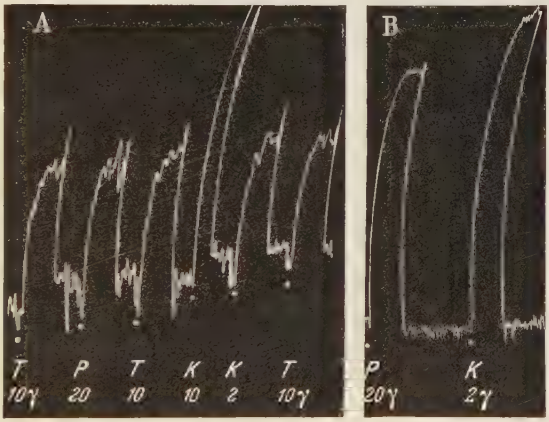


Abb. 5. Bradykininbildung durch Vollgift, „Koagulin" und „Protease". Isolierter Meerschweinchendarm. 20 ml Tyrode. 37° C. *Versuchsansätze* in 0,9% NaCl (p_H 6,8): 0,8 ml Globulinlösung (3%ig), 0,2 ml Vollgift (50 γ) bzw. „Koagulin" (10 γ oder 50 γ) bzw. „Protease" (100 γ). A: 3 min Inkubation, B: 20 min Inkubation bei 20° C. Injektion von je 0,2 ml = 10 γ T (Vollgift), 2—10 γ K („Koagulin"), 20 γ P („Protease"). *Ergebnis*: „Koagulin" ist 10mal wirksamer als „Protease"

Stoff aus Globulinen entstehen zu lassen. Dafür spricht die p_H-Abhängigkeit der Wirkung (Abb. 6). Inkubiert man gleiche Mengen Koagulin und Protease mit Globulinen, so erfolgt die Bradykininbildung durch Koagulin am besten bei p_H 6,5 und nimmt mit der Inkubationsdauer zu; die Bradykininbildung durch „Protease" am besten bei p_H 8, wobei es mit zunehmender Inkubationsdauer offenbar zu einer mit der Bildung Schritt haltenden und diese dann übertreffenden Inaktivierung des darmerregenden Stoffes kommt. Hierbei bleibt offen, ob die bradykinin*zerstörende* Wirkung einem besonderen, vielleicht chymotrypsinähnlichen Ferment zukommt, das erst einer Aktivierung durch die trypsinähnliche Protease bedarf.

Versuche mit dem Toxin der *Vipera Russeli* sprechen dafür, daß die bei Inkubation von Globulinen mit der Proteasefraktion des Bothropsgiftes

bei p_H 8 erfolgende Bradykinin*bildung* und *-zerstörung* nicht durch ein und dasselbe Ferment verursacht ist. Mit der bei 40% Ammonsulfatsättigung fallenden — der „Protease" des Bothropsgiftes entsprechenden — Proteinfraktion des *Russeli*-Toxins läßt sich *keine* Bradykinin*bildung* nachweisen. Inkubiert man sie aber mit fertigem Bradykinin, so wird dieses zerstört.

Bradykininpräparat. 500 mg Bothropsgift in 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung werden mit 2,5 Liter Globulinlösung (3%ig) 5 min bei 37° C inkubiert. Das Inkubat wird in die doppelte Menge siedenden Äthanols gegossen. Vom Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Trockenrückstand wird mit Äther und Aceton zur Entfernung von Lipoiden extrahiert.

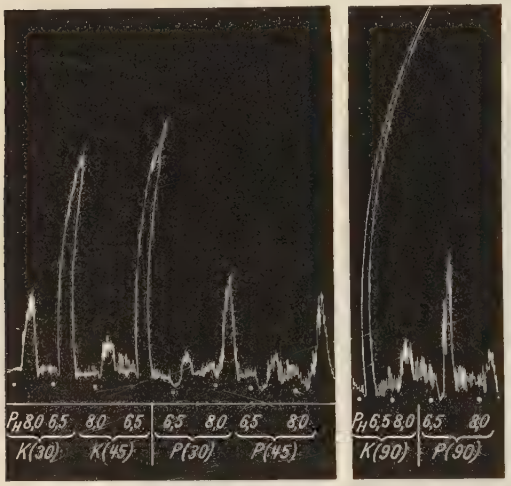


Abb. 6. p_H-Abhängigkeit der Bradykininbildung und -zerstörung. Versuchsanordnung wie in Abb. 5. *Versuchsansätze:* 1,6 ml Globulinlösung (3%ig) in NaCl. 0,2 ml m/1 Na-phosphatpuffer, p_H 6,5 bzw. 8,0. 0,2 ml „Koagulin" bzw. „Protease" (je 40 γ). Inkubation bei 20°C: 30, 45, 90 min. (Die eingeklammerten Zahlen geben die Inkubationszeit in Minuten an.) *Ergebnis:* Die Bradykininbildung durch „Koagulin" erfolgt besser bei p_H 6,5 als bei p_H 8 und nimmt mit der Inkubationsdauer zu. — Die Bradykininbildung durch „Protease" erfolgt nur bei p_H 8. Mit zunehmender Inkubationsdauer wird das gebildete Bradykinin zerstört

Bemerkungen

1. An der gerinnungsfördernden Wirkung des *Bothrops*giftes sind zwei verschiedene Proteine beteiligt, die sich durch fraktionierte Ammonsulfatfällung anreichern und voneinander trennen lassen. Das bei 60% Sättigung ausgefällte, nur schwach proteolytische „*Koagulin*" wirkt thrombinähnlich, indem es wie dieses Fibrinogen *direkt* coaguliert; die bei 40% Sättigung ausgefällte — im Anson-Test stark proteolytisch wirksame — „Protease" wirkt *indirekt*, indem sie durch Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin die Blutgerinnung herbeiführt. Die thrombinähnliche Wirkung des „Koagulins" ist durch *Heparin* nicht hemmbar, die Wirkung der „Protease" läßt sich, da sie eine indirekte Thrombinwirkung ist, durch Heparin aufheben. Wenn somit auch „proteolytische" und „coagulierende" Aktivität nicht miteinander parallel gehen, so dürfte der *Mechanismus* der „Koagulinwirkung", obwohl er im Anson-Test nicht als solcher in Erscheinung tritt, trotzdem ein *proteolytischer* sein: derjenige einer Protease, die, wie das physiologische Gerinnungsferment *Thrombin*, aus Fibrinogen als ihrem

spezifischen Substrat ein Polypeptid — „Fibrinopeptid" — abspaltet und damit die Koagulation einleitet.

Neuere Untersuchungen über den Mechanismus der Blutgerinnung haben den *enzymatischen* Charakter der Thrombinwirkung erwiesen und zu dem Ergebnis geführt, daß der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin ein 2phasischer Ablauf zugrunde liegt: in einer ersten „*chemischen*" Phase spaltet Thrombin aus Fibrinogen ein „Fibrinopeptid" ab, das reich an Glutaminsäure-endgruppen ist (Lorand). Diese Reaktion erfolgt auch bei p_H 5 und in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und führt *nicht* zu Viscositätsänderungen oder Gelbildung; in einer zweiten „*physikalisch-chemischen*" Phase kommt es dann — bei neutraler Reaktion — spontan zur Polymerisation bzw. Aggregation der „aktivierten" Fibrinogenmoleküle, wobei das Wesen dieser Aktivierung in der enzymatischen Abspaltung elektrisch negativer Ladungen erblickt wird. Vom Gesamt-N des Fibrinogens können durch Thrombin bis zu 3% als Nichteiweiß-N freigesetzt werden. Nach Freisetzung von $^1/_4$ dieser Menge beginnt die sichtbare Gelbildung.

2. Auch der *Bradykininbildung* aus einer den Plasmaglobulinen angehörenden inaktiven Vorstufe dürfte eine Proteolyse zugrunde liegen. Wenn deshalb die bei p_H 6,5 untersuchte bradykininbildende Wirkung sich wiederum überwiegend in der „proteolytisch" nur wenig wirksamen Koagulinfraktion des Bothropsgiftes findet, so muß es sich um die Wirkung einer Protease von so hoher Substratspezifität handeln, daß nur das spezifische Substrat „Bradykininogen", nicht aber die übrigen Globuline angegriffen werden. Damit wird es unwahrscheinlich, daß der bei p_H 8 durch die „Protease" des Giftes gebildete darmerregende Stoff mit demjenigen identisch ist, der bei p_H 6,5 unter der Einwirkung von „Koagulin" entsteht.

3. Die blutgerinnungsfördernde Wirkung des subcutan injizierten Giftes ist durch die prothrombinaktivierende „Protease" verursacht und wird durch Heparin verhindert. Wenn deshalb nach einem Vorschlag von v. Klobusitzky die Standardisierung gerinnungsfördernder Präparate aus Schlangengift in vitro durch Ermittlung ihrer Wirksamkeit auf Oxalatblut erfolgt, und die Verkürzung der Gerinnungszeit als Kriterium der Aktivität dient, so dürfte dabei hauptsächlich die *in vivo* nicht ins Gewicht fallende Wirkung des „Koagulins" erfaßt werden, und die ermittelte „Aktivität" der therapeutischen Wirksamkeit nicht entsprechen.

Summary

1. Protein fractions with a different relation of *proteolytic* to *coagulating* activity were obtained by ammonium sulphate fractionation of the venom from *Bothrops jararaca*. The precipitate at 40% saturation possessed only feeble coagulating, but strong proteolytic activity („Protease"), whereas there was feeble proteolytic and strong coagulating activity in the precipitate at 60% saturation („Koagulin").

2. A substance which stimulated the intestine, probably bradykinin, was formed on incubation of „Koagulin" or „Protease" with plasma

globulins. With „Koagulin" the formation was optimal at p_H 6,5 and increased with the duration of incubation; with „Protease" the p_H optimum was 8,0 and the gut stimulating activity decreased with prolonged incubation.

3. The effects of the „Koagulin"- and the „Protease" fraction of the venom — the thrombin-like activity, the activation of prothrombin and the formation and destruction of bradykinin — were ascribed to different substrate-specific proteases.

Literatur

Alexander, B., R. Goldstein and G. Landwehr: J. Clin. Invest. **29**, 881 (1950). — Anson, M., and A. E. Mirsky: J. Gen. Physiol. **22**, 79 (1939). — Eagle, H.: J. of Exper. Med. **65**, 613 (1937). — Folin, O. u. V. Ciocalten: J. Biol. Chem. **73**, 627 (1927). — Jansky, B.: Arch. of Biochem. **28**, 139 (1950). — Klobusitzky, D. v.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 361 (1951). — Lorand, L.: Biochemic. J. **52**, 196, 200 (1952). — Nature (Lond.) **167**, 992 (1952). — Physiologic. Rev. **34**, 742 (1954). — Rocha e Silva, M.: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 271 (1951).

Prof. Dr. P. Holtz, Frankfurt/Main, Pharmakol. Inst. d. Univ., Ludwig Rehn-Str.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 123—138 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die Erzeugung von Natrium- und Wasserretentionen zur Prüfung der Diuretica

Von

H. Herken, G. Senft und H. Wilutzky

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. März 1956)

Die vielbenutzte Auswertung der Diuretica an gesunden Versuchstieren nach dem von J. H. Burn (1931, 1937) vorgeschlagenen Verfahren gestattet ohne Zweifel, bestimmte qualitative Aussagen über den Effekt solcher Mittel im akuten Versuch. Hierbei darf aber nicht übersehen werden, daß diese Methode ursprünglich zur Testung des antidiuretischen Hormones entwickelt wurde. Die Entdeckung stark wirksamer Halocortine und ihre vermehrte Ausscheidung bei Ödemkranken hat aber in den letzten Jahren die Ansicht gestärkt, daß eine gesteigerte Natriumretention durch vermehrte Rückresorption in den Tubulusepithelien der Niere die wesentliche Ursache für die Störungen des Wasserhaushaltes darstellt (B. Singer u. I. Wener 1953, J. A. Luetscher u. B. B. Johnson 1954, J. G. Llaurado 1955).

Zwischen den Halocortinen und dem antidiuretischen Hormon der Hypophyse bestehen nicht nur besondere Beziehungen auf dem Wege über die von E. B. Verney (1947) beschriebenen Osmoreceptoren, die sich synergistisch auswirken, sondern offensichtlich auch Antagonismen (R. Gaunt, J. H. Birnie u. W. J. Eversole 1949), so daß eine allgemeingültige Klärung der Frage, welche Störung im Hormonhaushalt für die Entstehung der verschiedenen Ödemerkrankungen ursächlich verantwortlich ist, bisher noch nicht erreicht werden konnte. Ebenso ist noch nicht entschieden, welche Rolle „Volumoreceptoren" bei der Ödementstehung spielen.

Auch die grundlegenden Beobachtungen von E. H. Starling (1909) über die Pathogenese des Ödems sind anscheinend nur für bestimmte Erkrankungen gültig, zumal sich die Befunde häufen, die keine einwandfreien Beziehungen zwischen der Erhöhung des Venendruckes und dem Ausmaß der Wasserretention erkennen lassen (R. Goldman u. S. H. Basset 1955). Die Mehrzahl der Autoren, die sich mit dem Mechanismus der Ödementstehung beschäftigt haben, berichtet übereinstimmend, daß sich alle schweren Ödemfälle durch starke Retention von Kochsalzmengen auszeichnen, die der gesunde Organismus mühelos eliminieren kann.

Für die Beurteilung der klinischen Leistungsfähigkeit der Diuretica bei den verschiedenen Ödemerkrankungen ist vor allem die Aufklärung der Frage wichtig, in welchem Umfang die zur Natriumretention führenden Faktoren auch die diuretischen Effekte beeinflussen. Hierüber liegen nur wenige Beobachtungen vor (Axelrod u. Pitts 1952).

Im Verlaufe unserer Untersuchungen an ödemkranken Patienten haben wir durch eingehende Natriumbilanzen ermittelt, daß die Wirkung verschiedener Diuretica bei Fällen mit extremer Natriumretention auffallend gering war (Hans Herken 1955, Heinz Wilutzky u. Herbert Herken 1955). Da eine Aufklärung der Ursachen dieser Leistungsminderung im klinischen Versuch auf beträchtliche Schwierigkeiten stieß, haben wir untersucht, ob sich mit Hilfe einer geeigneten Versuchsanordnung äquivalente Bedingungen herstellen lassen, die eine Prüfung der verschiedenen Diuretica an natrium- und wasserretinierenden Tieren ermöglichten.

Die experimentelle Erzeugung von Ödemen ist auf verschiedene Weise versucht worden. Für die Lösung unserer eigenen Fragestellung war vor allem die schon von Knud Møller (1927), sowie von G. Kuschinsky u. H. Langecker

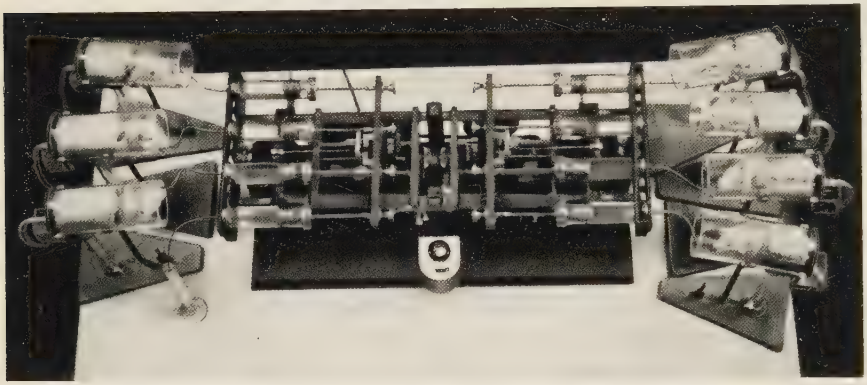


Abb. 1. Versuchsanordnung zur oralen Dauerdurchströmung mit physiol. Salzlösung

(1947) gemachte Beobachtung wichtig, daß sowohl intravenöse als auch oral infundierte physiologische Salzlösungen von den Versuchstieren in bestimmtem Umfang retiniert werden. Meist handelte es sich dabei aber um kurzfristige Versuche, die keine genügende Auskunft über die Intensität der uns besonders interessierenden Natriumretention gaben.

Unter den neueren Verfahren schien uns eine Methode von R. H. Kellogg, W. R. Burack u. K. J. Isselbacher (1954) zur Aufklärung der diskutierten Fragen brauchbar, die zu vergleichenden Untersuchungen der Diurese bei oraler bzw. intravenöser Dauerinfusion von isotonischen Salzlösungen und destilliertem Wasser benutzt wurde. Durch Aufstellung genauer Wasser- und Natriumbilanzen an Ratten ging es den Autoren im wesentlichen darum, die Veränderungen im Wasser- und Mineralhaushalt der Versuchstiere bis zur Erreichung eines sogenannten „steady state" zu verfolgen. Die bisher vorliegenden Untersuchungen dieser Autoren ließen allerdings nicht erkennen, ob sich durch Variation der Versuchsanordnung auch stärkere Ödeme bei den Versuchstieren hervorrufen lassen. Da eine solche Prüfung ebenso wie die vergleichende Auswirkung der Wirkung harntreibender Mittel eine Anordnung für Serienversuche erfordert, mußte das erwähnte Verfahren in bestimmter Weise abgeändert werden.

Methodik

Zur Durchführung von Reihenuntersuchungen wurde eine Infusionspumpe für 8 Injektionsspritzen gebaut, die, durch einen Synchronmotor angetrieben, mit Hilfe verschiedener Übersetzungen eine Variation der Infusionsgeschwindigkeit von 1—7 ml/Std erlaubt. Diese Anordnung ermöglicht eine kontinuierliche Zufuhr von Flüssigkeit durch einen Katheter in den Magen oder in die Schwanzvene von 8 in je einem Plexiglaskäfig besonderer Konstruktion sitzenden männlichen Ratten, deren Stuhl- und Urinausscheidung getrennt aufgefangen wurde (Abb. 1).

Nach einem Vorschlag von R. H. Kellogg, W. R. Burack u. K. J. Isselbacher soll die Magensonde durch ein die Backe des Versuchstieres durchbohrendes

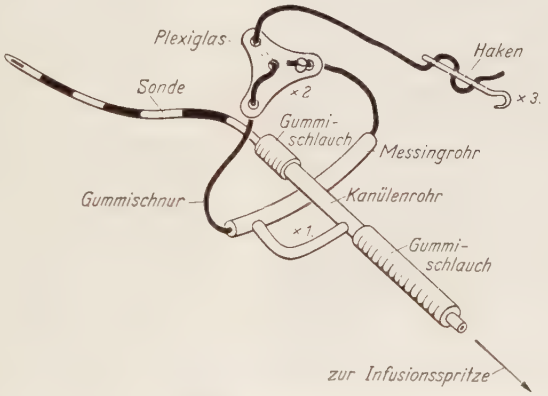


Abb. 2. Befestigung der Sonde. × 1. Aussparung für die Oberkieferzähne der Ratte. × 2. Die Plexiglasplatte liegt auf der Stirn der Ratte. × 3. Der Haken wird in eine Öse eingehakt, die auf einem breiten Gummiband befestigt ist, das hinter den Vorderpfoten den Leib der Ratten umfaßt

Kanülenrohr geleitet werden. Diese Versuchsanordnung erwies sich als wenig zweckmäßig, da sie bei wiederholten Experimenten starke Entzündungserscheinungen hervorrief. Aus diesem Grunde legten wir eine Sonde (Hauptner Nr. 3, Durchmesser 1 mm) durch ein am Oberkiefer der Ratte befestigtes Kanülenrohr. Die Einrichtung zur Befestigung ist in der Abb. 2 dargestellt. Die Ratte wurde in dem Einzelkäfig durch einen Ring aus Plexiglas, der locker um den Hals gelegt wurde, in ihren Bewegungen eingeschränkt. Der Ring lag auf einem verstellbaren Widerlager innerhalb des röhrenförmigen Käfigs, dessen Gestalt aus der Abb. 3 hervorgeht[1]. Vor den Versuchen erhielten die Ratten normale Körner-Wasser-Diät.

Die in den Magen der Versuchstiere infundierte Salzlösung hatte einen Gehalt von 154 μval Na und 5.6 μval K ml. Die Bestimmungen von Natrium und Kalium im Urin der Ratten wurden mit einem Beckman-Spektrophotometer DU mit Multiplier und Flammenphotometerzusatz durchgeführt. Wir benutzten für unsere Messungen eine Reihe von Eichlösungen mit abgestuften Elektrolytkonzentrationen, wie sie in der Arbeit von R. E. Mosher, A. J. Boyle, E. J. Bird, S. D. Jacobson, T. M. Batchelor, L. T. Iseri u. G. B. Myers (1949) angegeben worden sind. In einzelnen Versuchen bestimmten wir auch die Chloridausscheidung durch Titration nach Mohr in der Modifikation nach K. O. Larsson (1913). Mit Silbernitrat reagierende Substanzen (z. B. Purinkörper) wurden durch Schütteln des Harnes mit Tierkohle entfernt.

[1] Für die Anfertigung der Infusionseinrichtung danken wir dem Mechanikermeister unseres Institutes Helmut Dietz.

Für die Aufstellung genauer Wasserbilanzen war es zunächst wichtig, die Flüssigkeitsmenge zu ermitteln, die bei einer Versuchsdauer von 24 Std nicht durch die Nieren oder den Stuhl ausgeschieden werden, im wesentlichen also um die Feststellung der extrarenalen Flüssigkeitsverluste. Durch Berechnung der Differenz zwischen der infundierten und ausgeschiedenen Flüssigkeitsmenge sowie der Gewichtsunterschiede der Ratten vor und nach dem Versuch erhielten wir einen Wert, der für die Aufstellung der Flüssigkeitsbilanz in den vergleichenden Versuchsreihen genügend geeignet war. Die Tiere wurden vor und nach dem Versuch mit ihrem Käfig gewogen, wobei die ausgeschiedenen Stuhlmengen stets einbezogen wurden. Die Verwendung männlicher Tiere ermöglichte eine gute Auftrennung von Stuhl und Harn. Die extrarenalen Flüssigkeitsverluste ermittelten wir aus folgenden Werten:

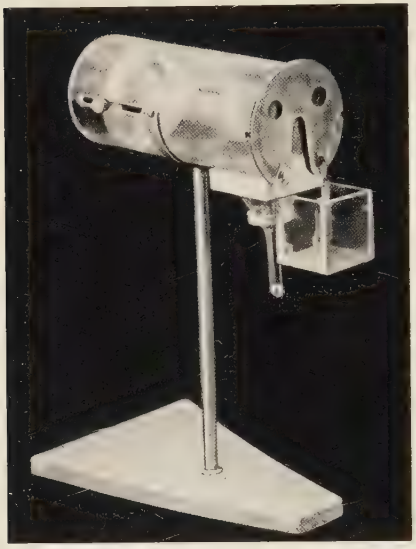


Abb. 3. Plexiglaskäfig

$(G_B - G_E) + (Fl_E - Fl_A)$ = extrarenale Flüssigkeitsverluste.

Hierbei bedeuten:

G_B = Gewicht der Tiere und des Käfigs zu Beginn des Versuches.

G_E = Gewicht der Tiere mit Käfig und ausgeschiedenem Kot am Ende des Versuches.

Fl_E = Infundierte Flüssigkeitsmenge.

Fl_A = Flüssigkeitsausfuhr.

Zur Bestimmung dieser Werte wurden die Versuchstiere in drei Gewichtsklassen aufgeteilt, um festzustellen, ob sich bei schweren Tieren größere Abweichungen finden. Die Tab. 1 zeigt, daß dies nicht der Fall ist.

Die Verluste an Körpersubstanz, die während der Versuche auftreten, gehen in die Bestimmung der extrarenalen Flüssigkeitsverluste mit ein. Ihre gesonderte Erfassung ist für die Auswertung der Versuchsergebnisse von untergeordneter Bedeutung. Die Gruppe A umfaßt die Tiere im Gewicht von 228 g (arithmet. Mittel) $\sigma \pm 15$, die Gruppe B wog im Mittel 275 g $\sigma \pm 13$, die Gruppe C enthielt mit 337 g $\sigma \pm 19$ die schwersten und ältesten (über 400 Tage) Tiere (Tab. 1).

Der Flüssigkeitsverlust durch die perspiratio insensibilis ist bei den 24stündigen Versuchen verhältnismäßig groß. Aus den gesamten Versuchen der drei Gruppen errechnet sich ein Mittelwert von 17,3 ml mit einer Standardabweichung von $\pm$ 1,7 ml. Bei allen Experimenten wurden die äußeren Bedingungen, vor allem die Temperatur bei 23° C konstant gehalten. Die Schwankungen der Luftfeuchtigkeit hatten keinen erkennbaren Einfluß auf die Ermittlung der Werte. Bei einer Gesamtzufuhr von 47,5 ml werden von der infundierten Flüssigkeitsmenge annähernd 37% nicht über die Nieren ausgeschieden. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur niedergelegten Angaben von E. F. Adolph u. J. P. Northrop (1952) hinreichend überein, die unter anderen Versuchsbedingungen mit einem Wasserverlust von 0,1 bis 0,4% des Körpergewichtes je Stunde durch die perspiratio insensibilis rechnen.

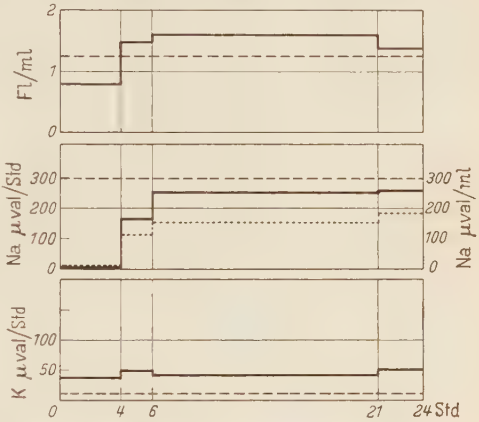


Abb. 4. Wasser-, Na- und K-Ausscheidung bei einer oralen Dauerdurchströmung mit physiologischer Salzlösung (47,5 ml Wasser, 7315 µval Na, 266 µval K). — — — Einfuhr (Na und K/Stunde; Fl./St. nach Abzug des e. Fl.). ——— Ausfuhr (Fl., Na und K/Stunde). ..... Ausfuhr (Na/ml)

Obwohl bei der Ermittlung der extrarenalen Flüssigkeitsverluste zwischen den Tieren verschiedenen Gewichtes keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden, weil die Gewichtsdifferenzen und die Abweichungen im Stoffwechsel offensichtlich zu gering sind, erwies sich die Aufteilung nach Gewichtsgruppen für die Durchführung der Natrium- und Kaliumbilanzen als sehr zweckmäßig. Schon bei den ersten Versuchen über die Bestimmung des Zeitraumes, der bis zur Erreichung des sogenannten steady state vergeht, bei dem sich Zufuhr und Ausscheidung von Wasser und Natrium die Waage halten, machten wir Beobachtungen über auffällige Unterschiede, die eine klare Abhängigkeit von dem Gewicht der Versuchstiere erkennen ließen.

Zunächst soll der Ablauf der Experimente bei oraler Dauerinfusion einer isotonischen Salzlösung an je einem charakteristischen Beispiel der Gruppe A, B und C demonstriert werden. Da die Harnausscheidung der Tiere nicht kontinuierlich erfolgt, worauf auch schon von G. Kuschinsky u. H. Langecker (1947) hingewiesen wurde, müssen die zeitlichen Abstände zwischen den Untersuchungen der eliminierten Harnmengen verhältnismäßig groß gewählt werden. Die Abb. 4 zeigt einen Versuch an einem Tier der Gewichtsgruppe A (Mittelwert 228 g, σ $\pm$ 15). Bei einer

Tabelle 1. *Bestimmung der extrarenalen Flüssigkeitsverluste während einer 24stündigen oralen Infusion mit 47,5 ml physiologischer Kochsalzlösung*

	G_B: g	G_E: g	Fl_A : ml	extraren. Fl. : ml
Gruppe A:	786	775	40,2	18,3
	736	730	35,6	17,9
	793,5	787,5	34,7	18,8
	736	731	33,0	14,5
	779,8	768	40,8	18,5
	744,4	733,2	40,8	17,9
	805	796	38,0	18,5
	788,6	781,5	38,4	16,2
	727,1	715	40,8	18,8
	801	704,3	34,6	19,6
	749	745	34,6	16,9
	788	778	38,4	19,1
	748	742	32,6	20,9
	819	814	33,4	19,1
	781	775,6	39,8	13,7
	743	738	32,6	19,9
	750	738	43,9	15,6
	813	807	36,6	16,9
	780	769	43,8	14,7
	751	745	38,4	15,1
	802	793	39,2	17,3
	761	749	42,6	16,9
			Arithmet. Mittel:	17,5
Gruppe B:	814,6	819,8	25,4	16,9
	774	782	22,4	17,1
	839	845	22,0	19,5
	780	788	23,8	16,7
	831,8	840	23,8	15,5
	785,4	791	24,6	17,3
	858	867	23,2	15,3
	825	831	24,0	17,5
	785	791	25,0	16,5
	832	835	29,6	14,9
	828	831	25,0	19,5
	792	802	19,8	17,7
	751	764	19,5	15,0
	822	825	27,4	17,1
	780	786	25,6	15,9
	851	850	28,0	20,5
	805	811	24,6	16,9
	828	833	26,0	16,5
	802	810	19,6	19,9
	854	859	27,4	15,1
	829	831	27,4	18,1
	786	797	29,4	17,1
			Arithmet. Mittel:	17,1

Tabelle 1. (Fortsetzung)

	G_B: g	G_E: g	Fl_A: ml	extraren. Fl.: ml
Gruppe C:	879	895	14,0	17,5
	808	829	10,6	15,9
	865	822	13,6	16,9
	827	847	12,0	15,5
	834	844	17,6	19,9
	815	831	15,5	16,0
	894	906	17,4	18,1
	878	892	16,6	17,9
	807	822	15,6	16,9
	872	885	17,0	19,5
			Arithmet. Mittel:	17,4
			Arithmet. Mittel d. p. i. aller drei Gruppen:	17,3
			Standardabweichung	1,7

Infusionsgeschwindigkeit von 1,98 ml/Std wird nach etwa 6 Std ein Ausgleich zwischen Einfuhr und Ausscheidung erreicht. Nach Abzug der extrarenal abgegebenen Flüssigkeitsmenge findet sich eine gering überschießende Wasserdiurese. Die oral zugeführte Salzlösung wird fast vollständig resorbiert, denn im Stuhl wurden während des gesamten Versuches nur 250 μval Natrium ausgeschieden. Die Natriumverluste durch die Haut sind ebenfalls unbedeutend. Sie betrugen nicht mehr als 500 μval Natrium in 24 Std. Aus dem Ablauf des Versuches ergibt sich, daß die im Beginn auftretende Natrium- und Wasserretention sehr schnell wieder rückgängig gemacht wird, so daß auch die Natriumbilanz vollständig ausgeglichen ist. Die primäre Natriumretention läßt sich auch aus der Harnkonzentration erkennen, die in den ersten Stunden nur 9 μval/ml beträgt, um nach 6 Std auf etwa 157 μval Na/ml anzusteigen. In den letzen 3 Std wird mit 187 μval/ml ein Wert erreicht, der den Gehalt der infundierten Salzlösung um 33 μval übersteigt. Der konstante Kaliumverlust der Tiere ist auffallend. Er hat zweifellos seine wesentliche Ursache in den regelmäßigen Gewebeverlusten der Tiere.

Ein charakteristisches Beispiel aus der Versuchsgruppe B (Mittelwert 275 g, $\sigma \pm 13$) zeigt ein deutlich abweichendes Verhalten (Abb. 5).

Der Ausgleich zwischen Zufuhr und Ausscheidung von Natrium und Wasser wird erst nach 21 Std erreicht, wenn der Wert für die perspiratio insensibilis und die Natriumverluste über die Haut und den Darm berücksichtigt werden. Die Aufstellung der Gesamtbilanz ergibt jedoch, daß die Tiere dieser Gruppe die infundierte Salzlösung nicht quantitativ eliminieren können. Bei einer Retention von 3027 μval Natrium werden 5,8 ml Flüssigkeit zurückgehalten. Die Kaliumausscheidung zeigt gegenüber den Tieren der Gruppe A keine wesentliche Abweichung.

Noch auffälliger war das Verhalten der Tiere aus der Gruppe C (Mittelwert 337 g, $\sigma \pm 19$). Aus der Abb. 6 geht hervor, daß ein steady state auch nach 24 Std nicht zustande kommt. In dieser Gruppe finden sich daher die Tiere mit den stärksten Natrium- und Wasserretentionen. Nach Abzug der perspiratio insensibilis, sowie der Natriummenge, die über den Stuhl und die Haut ausgeschieden werden, retinierte das Versuchstier in 24 Std 16,7 ml Flüssigkeit und 4336 μval Natrium. Eine primäre Natriumretention findet sich gleichmäßig bei allen drei Versuchsgruppen. Auch in dem zuletzt angeführten Versuch wird erst nach einigen Stunden die höchste Harnkonzentration mit etwa 200 μval Na/ml erreicht. Der Wert liegt erheblich unter dem Konzentrierungsvermögen der Rattenniere, der von E. Schütte (1949) mit etwa 4 g-% Kochsalz im Harn angegeben wird. Unter noch extremeren Bedingungen fand K. Krisch (1955) im Institut von E. Schütte Maximalwerte bis zu 1000 mval Chlor/l Harn. Das entspricht einer Konzentration von 5,9% Kochsalz. Der Ablauf der Versuche in der Gruppe C läßt besonders eindrucksvoll erkennen, daß die Tiere nach anfänglich überwiegender Natriumretention erst sehr viel später Wasser zurückhalten, wobei die Frage noch offen bleiben muß, ob für das Zustandekommen dieses Effekts die Beteiligung des antidiuretischen Hormones unbedingt notwendig ist.

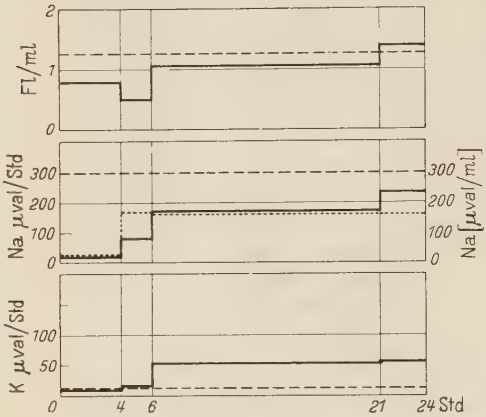


Abb. 5. Wasser-, Na- und K-Ausscheidung bei einer oralen Dauerdurchströmung mit physiologischer Salzlösung (47,5 ml Wasser, 7315 μval Na, 266 μval K). — — — Einfuhr (Na und K/Std; Fl./St nach Abzug des e. Fl.). ——— Ausfuhr (Fl., Na und K/Std). · · · · · Ausfuhr (Na/ml)

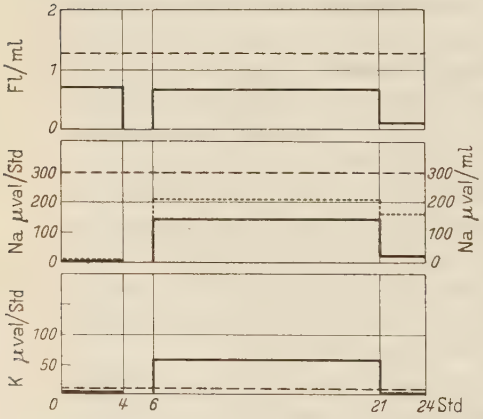


Abb. 6. Wasser-, Na- und K-Ausscheidung bei einer oralen Dauerdurchströmung mit physiologischer Salzlösung (47,5 ml Wasser, 7315 μval Na, 266 μval K). — — — Einfuhr (K und Na/Std; Fl./St. nach Abzug des e. Fl.). ——— Ausfuhr (Fl., Na und K/Std). · · · · · Ausfuhr (Na/ml)

Die Auswertung der Reihenversuche in Tab. 2 bestätigt, daß die orale Dauerinfusion einer isotonischen Salzlösung in den einzelnen Gruppen

stets gleichmäßige Störungen im Mineral- und Wasserhaushalt der Versuchstiere auslöst. Die Befunde weichen vor allem in den Gruppen B und C von den Ergebnissen, die KELLOGG, BURACK u. ISSELBACHER (1954) erhalten hatten, erheblich ab. Eine überschießende Diurese zu Beginn des Versuches, die erst später ausgeglichen wird, konnte in keinem Fall beobachtet werden. Lediglich in der Gruppe A stimmt die Gesamtbilanz mit den Ergebnissen der amerikanischen Autoren überein. Die von uns erhobenen Befunde entsprechen im Prinzip den Beobachtungen am

Tabelle 2. *Wasser-, Na- und K-Ausscheidung im Urin von Ratten nach einer 24stündigen oralen Dauerinfusion mit physiologischer Salzlösung* (154 μval Na, 5,6 μval K/ml)

	Flüssigkeit/ml			Na/μval			K/μval		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Gesamteinfuhr	47,5	47,5	47,5	7315	7315	7315	266	266	266
extraren. Flüssig.-verlust	—17,5	—17,1	—17,4						
Einfuhr n. Abzug des extraren. Fl.	30,0	30,4	30,1						
Versuchszahl	26	52	50	26	52	50	26	52	50
Arithmet. Mittel d. Harnausscheidung	38,0	24,4	14.2	5775	3451	1871	1328	1496	1282
Standardabweichung ($\pm \sigma$)	3,84	2,4	2,15	662	401	234	256	200	168

Menschen, die bei Zufuhr isotonischer Salzlösungen eine stärkere Ausscheidung von Wasser als von Salz erkennen ließen (M. LADD 1951; M. B. STRAUSS, R. K. DAVIS, J. D. ROSENBAUM u. E. C. ROSSMEISL 1951, G. BLOMHERT, J. GERBRANSY, J. A. MOLHUYSEN, L. A. DE VRIES u. J. G. G. BORST 1951). Die stärksten Veränderungen im Mineral- und Wasserhaushalt zeigen die Tiere der Gruppe B und C, wie sie schon durch die einzelnen Beispiele charakterisiert wurden, wobei die Retention von Natrium der des Wassers vorangeht und sie bei weitem überwiegt. Ein Vergleich der in den Reihenversuchen zurückgehaltenen Natrium- und Wassermengen zeigt bei den Versuchstieren der Gruppe B, daß bei einem Wert von 520 μval/ml relativ mehr Natrium retiniert wird als bei der Gruppe C, die infolge der stärkeren Wasserretention nur 295 μval Na/ml erreicht. Diese Zahlen geben natürlich nicht die Konzentration der Ödemflüssigkeit wieder, da sich die zurückgehaltenen Kochsalzmengen gleichmäßig auf den extracellulären Raum verteilen. Die absolut retinierten Natriummengen sind natürlich in der Gruppe C bedeutend größer, so daß diese Berechnung nur ein unvollständiges Bild über die Intensität der Störung im Mineral- und Wasserhaushalt gibt. In der

Gruppe B werden mit 20% der infundierten Flüssigkeitsmengen ungefähr 42,5% Natrium retiniert, wenn die Natriumausscheidung durch den Stuhl und die Haut vorher abgezogen wird. In der Gruppe C sind es dagegen 53% des zugeführten Wassers und sogar 64% der Natriumionen.

Die weitaus stärkere Wasserretention in der Gruppe C ist offensichtlich eine Folge der primären Anreicherung von Natriumionen bzw. von Kochsalz im Tierkörper. Zweifellos dient dieser Vorgang der Wiederherstellung isotonischer Verhältnisse in dem erzeugten Ödem. Die Störung des Mineralstoffwechsels und des Wasserhaushaltes nach oraler Dauerinfusion einer isotonischen Salzlösung läßt sich in den Versuchsgruppen B und C durch eine Gegenüberstellung der infundierten und ausgeschiedenen Natriumionen in den abschließenden Stunden der Versuche besonders eindrucksvoll demonstrieren (Abb. 7).

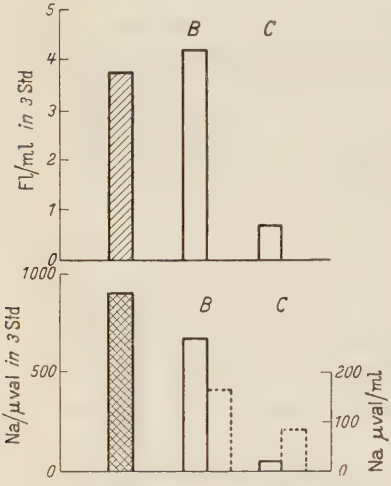


Abb. 7. Vergleich der Mittelwerte der Wasser- und Na-Ausscheidung sowie der Na-Konzentration im Urin von Ratten der Gruppen B und C während der 21.—24. Stunde. Einfuhr: ▨ Fl.; ▩ Na. Ausfuhr: ▭ Fl. und Na/3 Std, ⬚ Na/ml (Harnkonzentration)

Das experimentell erzeugte Ödemer liefert in der Gruppe C mit der stärksten Retention von Wasser und Natrium Symptome, die denjenigen bei menschlichen Erkrankungen in vielen Punkten ähnlich sind. Die Tiere hatten ausgeprägte Ödeme, die vor allem an Kopf und Pfoten deutlich sichtbar waren. Auch in der Gruppe B kann der Organismus die Natrium- und Wassermengen nicht vollständig eliminieren. Doch lassen gerade die Natrium- und Wasserbilanzen am Ende des Versuches erkennen, daß hier die anfängliche Natriumretention mit zunehmender Versuchsdauer nachläßt (vgl. Abb. 5—7).

Mit Hilfe der von uns verwendeten Versuchsanordnung lassen sich daher zwei Gruppen von Wasser und Natrium retinierenden Tieren darstellen, die so erhebliche Unterschiede im Ausmaß der erzielten Stoffwechselstörungen aufweisen, daß die Prüfung einiger Diuretica unter diesen pathologischen Bedingungen besonders interessant erschien. Da die gefundene Stoffwechselstörung durch die Dauerinfusion einer isotonischen Salzlösung ausgelöst und unterhalten wird, war es auch bei der anschließenden Prüfung der Diuretica notwendig, die Zufuhr der Salzlösung über die Dauer von 24 Std hinaus fortzusetzen. Wärend des angeschlossenen 5stündigen Testversuches erhielten die Tiere zur Vergrößerung der Harnausscheidung in diesem Teil des Versuches zusätzlich

eine einmalige Gabe von 5 ml der Durchströmungsflüssigkeit, die im Verlauf von 1 min durch den Magenkatheter infundiert wurde. Für die Aufstellung der Bilanz errechnet sich nach Abzug der Werte für die extrarenalen Flüssigkeitsverluste in der 5stündigen Testperiode eine Flüssigkeitsmenge von 11,3 ml, mit der 2295 μval Natrium und 84 μval Kalium zugeführt wurden. Als Diuretica kamen Theophyllin und 2-Acetylamino-1,3,4,-Thiodiazolsulfonamid (Diamox) zur Anwendung. die beide im Gegensatz zu den quecksilberhaltigen Diuretica auch an der Ratte stark wirksam sind. In orientierenden Versuchen haben wir als optimale Dosis 30 mg/kg für Theophyllin ermittelt, dessen Intensität durch größere Mengen nicht übertroffen wurde. Das Thiodiazolderivat, dessen Wirkung auf einer Behinderung des Ionenaustausches in den Tubulsepithelien durch Hemmung der Carboanhydratase beruht (R. O. Roblin jr. u. J. W. Clapp 1950, W. H. Miller, A. M. Dessert u. R. O. Roblin jr. 1950) zeigte bereits bei einer Dosis von

Tabelle 3. *Die Wirkung von Theophyllin und Diamox auf die Urin-, Natrium- und Kaliumausscheidung von Ratten der Gruppe B während einer 5stündigen Testperiode*

	Flüssigkeit 14,9 ml						Na 2295 μval						K 84 μval					
Gesunteinfuhr . . .																		
extraren. Flüssigkeitsverlust	— 3,6																	
Einfuhr nach Abzug d. extraren. Flüssigkeit	11,3																	
	Kontr.	Theophyllin 30 mg kg	Diamox 5 mg/kg	Diamox 10 mg/kg	Diamox 25 mg/kg	Kontr.	Theophyllin 30 mg/kg	Diamox 5 mg/kg	Diamox 10 mg/kg	Diamox 25 mg/kg	Kontr.	Theophyllin 30 mg/kg	Diamox 5 mg/kg	Diamox 10 mg/kg	Diamox 25 mg/kg			
Versuchszahl	18	10	8	8	8	18	10	8	8	8	18	10	8	8	8			
Arithmetisches Mittel d. Harnausscheidung	11,7	15.6	21,0	20,7	21,7	1887	2790	3767	3674	3611	249	354	707	741	739			
Standardabweichung ($= \sigma$)	0,78	1.4	0,6	1,1	0,79	176	236	64	226	164	51	31	26	72	19			
p.	0,0002		0,0002			0,0002		0,0002			0,0002		0,0002					

Tabelle 4. *Die Wirkung von Theophyllin und Diamox auf die Urin-, Natrium- und Kalium-Ausscheidung von Ratten der Gruppe C während einer 5stündigen Testperiode*

	24 Std Durchströmung			Flüssigkeit/ml			Testperiode (5 Std)					
							Na/μval			K/μval		
	Fl/ml	Na/μval	K/μval	Kontr.	Theophyllin 30 mg/kg	Diamox 30 mg/kg	Kontr.	Theophyllin 30 mg/kg	Diamox 30 mg/kg	Kontr.	Theophyllin 30 mg/kg	Diamox 30 mg/kg
Gesamteinfuhr	47,5	7315	266	14,9	14,9	14,9	2295	2295	2295	84	84	84
Einfuhr nach Abzug der extraren. Flüssigkeit	—17,4			—3,6	—3,6	—3,6						
Einfuhr	30,1	—	—	11,3	11,3	11,3	—	—	—	—	—	—
Harnausscheidung . .	6,2	1321	1222	1,2			117			197		
	10,4	1468	1175	2,3			340			212		
	9,3	1034	988	9,4			1430			236		
	6,9	1390	806	1,8			21			295		
	5,9	1144	996	3,2			334			283		
	4,4	191	1120	1,9			278			208		
	7,5	1001	1116	1,0			122			195		
	5,1	713	1166	1,7			200			236		
	4,9	396	1173	0,9			128			200		
	5,3	562	1099	2,0			236			198		
	11,4	1432	1219			3,9			678			320
	8,2	1232	1058			2,0			470			348
	12,6	1622	1098			8,0			1690			343
	8,1	1362	1047			19,0			2956			584
	4,9	333	1231			2,4			316			298
	5,5	948	1064			3,2			400			293
	9,0	983	1253			16,3			2412			601
	4,6	383	1158			3,5			371			322
	5,3	416	1237			2,2			298			277

Tabelle 4. (Fortsetzung)

	24 Std Durchströmung			Flüssigkeit/ml			Testperiode (5 Std)					
							Na/µval			K/µval		
	Fl/ml	Na/µval	K/µval	Kontr.	Theophyllin 30 mg/ml	Diamox 30 mg/kg	Kontr.	Theophyllin 30 mg/kg	Diamox 30 mg/kg	Kontr.	Theophyllin 30 mg/kg	Diamox 30 mg/kg
	7,8	1321	1186		4,8			626			295	
	8,8	1561	981		5,2			780			371	
	4,1	563	1282		4,0			582			324	
	5,9	963	1089		2,2			408			217	
	4,5	399	1134		3,2			501			288	
Arithmet. Mittel . . .				2,5	3,8	6,7	322	579	1065	226	299	376
Standardabweichung .				2,5	1,2	6,5	403	139	1020	36,5	56,3	125
					0,2	0,2		0,1	0,2		0,024	0,12
p					0,09			0,06			0,0027	

5 mg/kg einen starken Effekt, der auch durch Gaben von 10 und 25 mg/kg nicht mehr gesteigert werden konnte. Die Wirkung beider Diuretica wurde zunächst an Tieren der Versuchsgruppe B geprüft. Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus Tab. 3 läßt erkennen, daß die Diurese sowohl nach Verabreichung von Theophyllin wie Diamox gegenüber den Kontrolltieren signifikant vergrößert wird (Tab. 3). Das Thiodiazolderivat ist hier dem Theophyllin zweifellos überlegen. Da die Natrium- und Wasserbilanz in der 5stündigen Testperiode bei den Kontrolltieren ausgeglichen ist, sind die stark negativen Bilanzen nach Einwirkung von Theophyllin und Diamox so zu deuten, daß es hier zu einer Ausschwemmung der vorher retinierten Ödemflüssigkeit kommt. Bei den verhältnismäßig großen Diuresen ermöglicht daher dieses Verfahren wegen der gut zu erfassenden Differenzen auch quantitative Aussagen über die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Diuretica, die bei der Versuchsanordnung nach J. H. Burn infolge der erheblichen Streuungen der Ausscheidungswerte nur schwer ermittelt werden können. Auch die Kaliumausscheidung im

Harn ist nach Einwirkung beider Pharmaka gegenüber den Kontrolltieren erhöht.

Bei der Anwendung von Theophyllin und Diamox an den stark wasser- und natriumretinierenden Ratten der Gruppe C wurden nun bei gleicher Versuchsanordnung auffallende Unterschiede in der Wirkung beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt. Im Gegensatz zu den Kontrollen der Gruppe B retinieren die Kontrolltiere der Gruppe C auch in der 5stündigen Testperiode weiterhin Natrium und Wasser. Obwohl die Tiere dieser Gruppe daher über viel ausgedehntere Ödeme verfügen als in der Gruppe B, ist die Wirkung beider Diuretica auffallend gering. Die Steigerung der Harnausscheidung nach 30 mg/kg Theophyllin ist hier gegenüber den Kontrollen statistisch nicht gesichert. Auch Diamox erleidet einen deutlichen Wirkungsverlust. Die starken Streuungen der Versuchsergebnisse sind bei der Anwendung dieses Pharmakons unter diesen Bedingungen besonders auffällig. Ähnliche Beobachtungen sind auch am ödemkranken Patienten gemacht worden. Der etwas stärkere Effekt von Diamox ist in dieser Gruppe gegenüber dem des Theophyllins nicht signifikant.

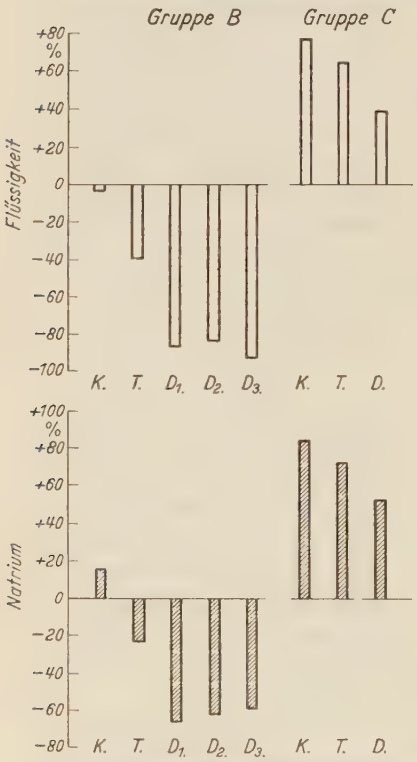


Abb. 8. Wasser- und Natriumbilanz nach Verabreichung von Theophyllin und Acetylaminothiodiazolsulfonamid (Diamox) an Ratten mit experimentellen Ödemen (5stündige Testperiode, Infusion von 11,3 ml Wasser und 2295 µval Na = 100%). *K* Kontrolle, *T*. Theophyllin (30 mg/kg), *D*. Diamox (30 mg/kg), D_1, D_2, D_3 Diamox (5, 10, 25 mg/kg)

Die Darstellung der Natrium- und Wasserbilanzen während der 5stündigen Testperiode liefert einen besonders anschaulichen Vergleich über die Unterschiede in den Wirkungen beider Diuretica an Tieren mit experimentellen Ödemen.

In der Gruppe B erzielen beide Diuretica überschießende Natrium- und Wasserausscheidungen. In der Gruppe C äußert sich der beträchtliche Wirkungsverlust in den nur mäßig veränderten Bilanzen.

Die Ermittlung der Natriumkonzentrationen im Harn während der 5stündigen Testperiode der Kontrolltiere und derjenigen nach Einwirkung von Theophyllin und Diamox gestattet eine gewisse Aussage

über die schon häufig diskutierte Frage, ob die Pharmaka eine bevorzugte Natrium- oder Wasserausscheidung verursachen. In der Versuchsgruppe B enthielt der Harn der Kontrolltiere 161 μval Na/ml. Nach Einwirkung von 30 mg/kg Theophyllin und 5 mg/kg Diamox stieg er gleichmäßig auf 179 μval Na/ml an. Da die infundierte Salzlösung 154 μval Na/ml enthält, ist eine stärkere Bevorzugung der Natriumausscheidung gegenüber dem Wasser erkennbar. Dadurch wird die vorausgegangene überwiegende Natriumretention zum größten Teil wieder beseitigt. Dies trifft aber nicht für die Tiere der Gruppe C zu, die nur 152 μval Na/ml nach 30 mg/kg Theophyllin und 159 μval Na/ml nach Einwirkung von 30 mg/kg Diamox ausscheiden. Aus der niedrigen Harnkonzentration von 128 μval Na/ml bei den Kontrolltieren läßt sich ebenso wie aus den Angaben der Tab. 4 entnehmen, daß in diesen Versuchen auch während der 5stündigen Testperiode mehr Natrium als Wasser retiniert wird. Nach Anwendung der Diuretica wird in dieser Gruppe nur eine mäßige Steigerung der Ausscheidung eines Harnes erreicht, der in seiner Natriumkonzentration dem Gehalt der infundierten isotonischen Salzlösung entspricht.

Das Versagen der Diuretica beruht sehr wahrscheinlich nicht auf Veränderungen im Säure-Basengleichgewicht, die als Folge einer vorübergehenden Retention von Natriumionen auftreten können. Die Analyse der im Harn ausgeschiedenen Natrium- und Chlorionen ergibt zwar in der Kontrollgruppe C mit 152 μval für das Na/ml und 170 μval Cl/ml einen gewissen Überschuß der Chlorionen, die eine relative Alkalose als Folgeerscheinung möglich macht. Eine derartige Alkalose kann die Wirkung bestimmter Diuretica beeinträchtigen. Sie gibt aber gerade im vorliegenden Fall keine befriedigende Erklärung für das Versagen von Diamox, denn das Carboanhydratasegift wirkt bei Vorliegen einer Alkalose besonders gut. Eine relative Acidose begünstigt dagegen die Wirkung des Theophyllins und vermindert den Effekt von Diamox beträchtlich. Änderungen im Säure-Basen-Gleichgewicht haben demnach konträre Folgen auf die Wirkung der benutzten Pharmaka.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse bilden anscheinend die zur Natriumretention führenden Faktoren die wesentlichste Ursache für den Wirkungsverlust der beiden Diuretica. Hier ergibt sich offensichtlich eine auffällige Parallele zu den Beobachtungen über ähnliche Wirkungsverluste am Menschen, deren Ödemerkrankung durch extreme Natriumretentionen gekennzeichnet war (H. Herken 1955, H. Wilutzky u. H. Herken 1955). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um die Auswirkungen der Mehrproduktion von Halocortinen in der Nebennierenrinde. Bei der Bewertung der gewonnenen Befunde darf allerdings nicht übersehen werden, daß sich die Versuchstiere der Gruppe C auch durch starke Wasserretention auszeichnen, an deren Zustandekommen das antidiuretische Hormon beteiligt sein kann. Zu der Frage, ob dieses Hormon die Wirkung der Diuretica beeinträchtigt, haben K. Unna u. L. Walterskirchen (1937) bereits Stellung genommen. Im Verlauf ihrer Untersuchungen haben diese Autoren auch das Theophyllin untersucht und gefunden, daß die erhöhte Wasserausscheidung nach Verabreichung dieses Diureticums durch Pituitrin nicht gehemmt wird. Unter ihren Versuchsbedingungen fanden diese Autoren sogar eine Steigerung des „chloruretischen" Effektes.

Summary

1. A continuous oral infusion of isotonic saline solution into rats is possible by using an infusion apparatus specially constructed for serial tests.

2. The effects of an oral infusion of isotonic saline solution on the water and sodium metabolism of animals with different weights are tested during a period of 24 hours with constant infusion speed.

3. The extrarenal fluid loss is calculated. By estimating the sodium and water balance the time is determined at which the input of the isotonic saline solution and the urinary excretion are balanced. Remarkable differences are observed proving a distinct relationship of urinary excretion to weight and age of the tested animals. Therefore the animals are divided into 3 weight-groups. The animals of the group A achieve the steady state very fast. In the groups B and C edema appears which is especially obvious in the biggest and oldest animals. The development of edema starts in all cases with a retention of sodium ions followed by the retention of water in a definite time.

4. The effects of theophylline and 2-acetylamino-1,3,4-thiodiazol-sulfonamid (Diamox) are tested on the experimental edema. Both diuretics cause a remarkable urinary excretion with negative sodium and water balance in the animals of the group B. Both substances disclose a remarkable loss of efficiency in the animals of the group C, the sodium and water balance still being positive.

5. The experimental edema of the rat may be used for testing the efficiency of diuretics and for analysing the hormonal influences on the diuresis.

Literatur

Adolph, E. A., and J. P. Northrop: Amer. J. Physiol. **168**, 320 (1952). — Axelrod, D. R., and R. P. Pitts: Amer. J. Physiol. **169**, 350 (1952). — Blomhert, G., G. Gerbrandy, J. A. Molhuysen, L. A. de Vries and J. G. G. Borst: Lancet **1951**, II, 1011. — Burn, J. H.: Quart. J. Pharm. Pharmak. **4**, 517 (1931); Biol. Auswertungsmethoden 1937, S. 57. — Gaunt, R., J. H. Birnie and W. J. Eversole: Physiologic. Rev. **29**, 281 (1949). — Goldman, R., and S. H. Bassett: Circulation (New York) **12**, 630 (1955). — Herken, H.: Ärztl. Wschr. **1955**, 773. — Kellogg, R. H., W. R. Burack and K. J. Isselbacher: Amer. J. Physiol. **177**, 27 (1954). — Krisch, K.: Dissert. Freie Universität Berlin 1955. — Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 742 (1947). - Ladd, M. J.: J. Appl. Physiol. **3**, 603 (1951). — Larsson, K. O.: Biochem. Z. **49**, 479 (1913). — Llaurado, J. G.: Lancet **1955**, 1295. — Luetscher jr., J. A., and B. B. Johnson: J. Clin. Invest. **33**, 276 (1954). - Miller, W. H., A. M. Dessert and R. O. Roblin jr:. J. Amer. Chem. Soc. **72**, 4893 (1950). — Møller, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **126**, 180 (1927). - Mosher, R. E., A. J. Boyle, E. J. Bird, S. D. Jacobson, T. M. Batchelor, L. T. Iseri and G. B. Myers: J. Clin. Path. **19**, 461 (1949). — Roblin jr., R. O., and J. W. Clapp: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 4890 (1950). — Schütte, E.: Angew. Chem. **1949**, 255. — Singer, B., and J. Wener: Amer. Heart J. **45**, 795 (1953). — Starling, E. H.: The fluids of the Body. London 1909. — Strauss, M. B., R. K. Davis, J. D. Rosenbaum and E. C. Rossmeisl: J. Clin. Invest. **30**, 862 (1951). — Unna, K., u. L. Walterskirchen: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **186**, 539 (1937). — Verney, E. B.: Proc. Roy. Soc. B. **135**, 1947. — Wilutzky, H., u. Herbert Herken: Dtsch. Arch. klin. Med. **202**, 477 (1955).

Prof. Dr. H. Herken, Berlin-Dahlem, Pharmakol. Institut d. Fr. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, 139—147 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler)

Über den enzymatischen Abbau der Substanz P

Von
O. Eber und F. Lembeck

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. März 1956)

Substanz P ist nach allen bisherigen Untersuchungsergebnissen als Polypeptid aufzufassen (Pernow 1953, Gaddum 1955). Eine enzymatische Zerstörung durch Polypeptidasen ist daher verständlich und verschiedentlich auch nachgewiesen worden.

Gaddum u. Schild (1934) berichteten, daß die Substanz-P-Aktivität eines Darmbreies bei Zimmertemperatur über viele Stunden erhalten bleibt, also autolytischen Prozessen gegenüber ziemlich widerstandsfähig ist. In eigenen, nicht veröffentlichten Versuchen, zeigte sich ähnliches auch mit der Substanz P-Aktivität von Gehirn. Euler (1936) fand eine Inaktivierung der Substanz P bei Inkubation mit Trypsin (Glycerinextrakt aus Pankreas). Pernow (1955) stellte fest, daß Chymotrypsin die Substanz P etwa 200mal schneller als Trypsin inaktiviert. Gullbring (1943) untersuchte die enzymatische Zerstörung durch verschiedene Gewebeextrakte, wobei sich bei einem p_H-Optimum von 6,5 folgende Enzymaktivität ergab: Gehirn (Basalganglien von Mensch und Pferd) > Muscularis propria des Pferdedarmes > quergestreifter Muskel > Blut und Rückenmark (− 0). Auch Chang u. Gaddum (1937) fanden keine Inaktivierung durch Blut. Enzymatischer Abbau bei einem p_H-Optimum von 7,6 –7,8 ist in allen Teilen des Verdauungstraktes zu finden, am stärksten im Duodenum und Jejunum. Liquor cerebrospinalis inaktiviert die Substanz P nicht. Das Substanz P-abbauende Enzym kann durch fraktionierte Ammonsulfatfällung gereinigt werden (Pernow 1955).

Frische Rohextrakte aus zerriebenen Rückenmarkswurzeln inaktivierten Substanz P nur gering, wesentlich stärker nach 15 –18stündigem Stehenlassen dieser Extrakte bei 33° C (Umrath 1953, Lembeck 1953). Mit solchen Rohextrakten wurde auch eine enzymatische Inaktivierung der, möglicherweise mit Substanz P identischen, gefäßerweiternden Substanz aus dorsalen Wurzeln („*Erregungssubstanz sensibler Nerven*") von Hellauer u. Umrath beobachtet, wobei Umrath (1953) den stärksten enzymatischen Abbau dieser Substanz zwischen p_H 4,9 und 7,8 fand, wenn mit 15 –18 Std bei 33° C aufbewahrten Hinterwurzel-Rohextrakten inkubiert wurde.

Holton u. Holton (1952) konnten als gefäßerweiternde Substanz in Vorder- und Hinterwurzeln ATP nachweisen. Homogenate frischer Hinterwurzeln behielten ihre gefäßerweiternde Wirkung am durchströmten Kaninchenohr nach Inkubation (2—3 Std bei 38° C), während Vorderwurzeln sie verloren; die Wirksamkeit von Acetonextrakten aus Vorder- und Hinterwurzeln nahm gleich schnell ab. Diese von Holton u. Holton (1952) beobachtete Gefäßerweiterung kann nur zu einem geringen Teil auf Substanz P zurückgehen, denn ein Extrakt aus 5 mg Vorderwurzeln

wirkte am Kaninchenohr kaum schwächer als 1 mg Substanz P (vermutlich 4 E Substanz P), obwohl in 5 mg Vorderwurzeln nicht mehr als 10 μg Substanz P enthalten sein könnten. Für den Unterschied zwischen Vorder- und Hinterwurzeln bei Inkubation der Rohextrakte wird folgendes in Erwägung gezogen: Ein acetonlöslicher Enzymaktivator, strukturelle Unterschiede zwischen Vorder- und Hinterwurzeln oder eine, mit der Zerstörung schritthaltende Neusynthese der gefäßerweiternden Substanz. Da aber die von Holton u. Holton (1954) beobachtete Gefäßerweiterung hauptsächlich auf ATP zurückgeführt werden konnte, ist es noch nicht entschieden, ob die erwähnten Inkubationsversuche mit Rückenmarkswurzeln überhaupt die Substanz P betreffen.

Weitere Untersuchungen über den enzymatischen Abbau der Substanz P sollten die Ergebnisse über die Enzymaktivität in verschiedenen Organen ergänzen, die Charakteristica dieses Enzymabbaues erfassen und zeigen, ob man ein spezifisches Enzym annehmen darf.

Methodik

Substanz P-Präparat. Das verwendete Präparat wurde nach der von Pernow (1953) angegebenen Methode hergestellt und gegen ein von Herrn Prof. U. S. v. Euler, Stockholm, überlassenes Präparat (4 E Substanz P/mg) standardisiert. Sämtliche Versuche wurden mit einem Präparat von 4,85 E/mg durchgeführt. Wie sich in Vorversuchen zeigte, war die Abbauquote mit weniger gereinigten Substanz P-Präparaten meist geringer; dies ist verständlich, da Ballaststoffe einen gewissen Teil der Kapazität des abbauenden Enzyms beanspruchen könnten.

Enzym-Präparat. Organe von Meerschweinchen wurden im Glashomogenisator sofort nach der Tötung des Tieres zerrieben. Nur Rückenmarkwurzeln wurden vom Rind genommen. 1 g Organbrei wurde mit 9 ml isotonem Natriumphosphatpuffer von p_H 6,5 (falls nicht eigens anders vermerkt) versetzt, kräftig geschüttelt und zentrifugiert. Das Überstehende wurde innerhalb von 1—2 Std verwendet. Diese Extrakte zeigten in den zu den folgenden Ansätzen verwendeten Mengen keine Darmwirksamkeit, wie Kontrollen ergaben.

Ansatz. 1 ml einer Substanz P-Lösung mit 73 E/ml wurde mit 1 ml der Enzymlösung versetzt und 30 min bei 37° C inkubiert; Abweichungen davon werden besonders erwähnt. Der Abbau wurde durch 2 min Einhängen in das kochende Wasserbad unterbrochen, die dabei entstehende Fällung abzentrifugiert und die Probe innerhalb von 4 Std am isolierten Meerschweinchenileum (37° C, Tyrode, Zusatz von je 1 μg Atropin und Neoantergan[1] pro Milliliter) mit der Kontrolle verglichen. Als Kontrolle diente derselbe Ansatz mit einer vorher durch 2 min Erhitzen am siedenden Wasserbad inaktivierten Enzymlösung.

Ergebnisse

Die Enzymaktivität in verschiedenen Organen. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind aus Tab. 1 zu ersehen. Zum Zweck der besseren Vergleichsmöglichkeit wurden die Ergebnisse in den 9 Versuchen jeweils auf den mittleren Abbau der Leber bezogen und als Prozent dieses Wertes angegeben. Auffallend ist die hohe Aktivität in Milz und Niere, die neben der Leber zu den an Kathepsinen reichsten Organen zählen. Die starke

[1] N-α-Pyridyl-p-Methoxybenzyl-N′-Dimethyl′-Äthylendiamin.

Wirksamkeit in Pankreas und Darm ist durch die Verdauungsfermente zu erklären. Das Gehirn wies in fast allen Versuchen nur wenig Wirksamkeit auf, wie im einzelnen später noch beschrieben wird.

Tabelle 1

		%	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Leber		72	17	50	75	35	35	58	72	69
2.	Leber	100									
	Niere	186	125	100	165	120	—	258	264	250	204
	Milz	176	—	—	—	—	229	185	108	—	184
	Pankreas	104	—	—	—	—	106	94	—	—	112
	Ileum	102	—	—	—	—	114	74	—	—	119
	Lunge	94	—	—	—	—	94	94	—	—	93
	Placenta	63	19	—	—	81	—	—	—	—	—
	Gehirn	52	40	100	34	35	—	—	—	—	—
	Herz	31	—	—	—	—	37	26	—	—	29
	Muskel	21	52	53	0	—	—	—	0	—	0
	Blut	12	24	0	18	7	—	—	—	—	—

1. Abbau von Substanz P (36,5 E/ml) durch Leberrohextrakt (entsprechend 50 mg Leber/ml) bei p_H 6,5 in 30 min. Die Zahlen geben den perzentuellen Abbau an.
2. Abbau durch andere Organextrakte unter den gleichen Bedingungen. Die Zahlen geben die Enzymaktivität im Vergleich zum Leberextrakt an.

Mit den starkwirkenden Organextrakten von Leber und Niere konnte der Abbau bis zur völligen Inaktivierung verfolgt werden. Dies wird am Beispiel der Niere gezeigt (Abb. 1). Wenn der Nierenbrei 24 Std bei 0°C aufbewahrt und dann erst zentrifugiert wurde, war seine Wirksamkeit höher als bei sofortiger Verwendung. Dies ist durch die in dieser Zeit erfolgte bessere Enzymextraktion zu erklären und nicht identisch mit der „Aktivierung" von Rückenmarkwurzelextrakten, die über Stunden bei 34°C aufbewahrt wurden.

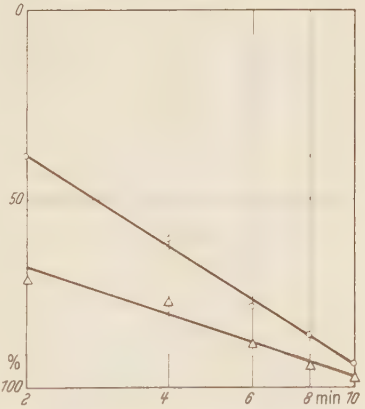


Abb. 1. Perzentueller Abbau von Substanz P durch einen Rohextrakt aus Niere bei p_H 6,5 im Verlauf von 10 min. O frischer Extrakt, /. Extrakt nach 24 Std bei 0° C

Der hohe Enzymgehalt der Niere bei nicht nachweisbaren Mengen an Substanz P ließ die Möglichkeit offen, daß letzterer Befund nur durch eine sehr rasche Inaktivierung der Substanz P in der Zeit zwischen Tötung und Extraktion vorgetäuscht sein könnte. Deshalb wurde Niere sofort nach der Tötung nur grob zerkleinert in kochendes Wasser geworfen, das p_H mit nHCl auf 5 gebracht und nach 5 min im kochenden Wasserbad das Gewebe samt Lösung homogenisiert, zentrifugiert und neutralisiert. Es fand sich auch in diesen Versuchen keine nachweisbare Menge an Substanz P.

Substanz P-Gehalt und Vorkommen von abbauenden Enzymen in verschiedenen Teilen des Zentralnervensystems. Alle bisherigen Untersuchungen über den Substanz P-Gehalt im Zentralnervensystem ergaben charakteristische Unterschiede einzelner Partien. Daher schien es von Bedeutung zu wissen, ob mit dieser Verteilung der Substanz P auch die Verteilung ihres abbauenden Enzymes parallel geht. Hierzu wurden folgende Abschnitte des Kaninchen-Zentralnervensystems verwendet: Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark.

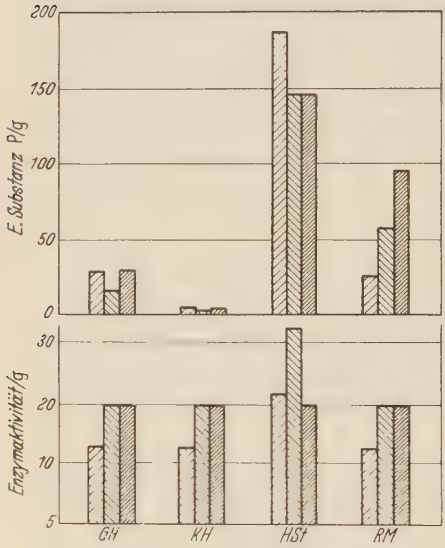


Abb. 2. Substanz P-Gehalt und dazugehörige Abbaufähigkeit von Substanz P im Großhirn (GH), Kleinhirn (KH), Hirnstamm (HSt) und Rückenmark (RM) des Kaninchens (3 Versuche). Die Enzymaktivität gibt den perzentuellen Abbau von Substanz P durch den jeweiligen Rohextrakt bei p_H 6,5 in 30 min an

Das Gewebe wurde zerrieben, die eine Hälfte mit der dreifachen Menge Aqua dest., nach Ansäuern mit nHCl auf p_H 5, für 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt und filtriert. Das Filtrat wurde kurz vor der Testung am Meerschweinchenileum neutralisiert. Die andere Hälfte des Gewebebreies wurde zur Bereitung eines Enzym-Präparates wie angegeben verwendet und mit der Substanz P-Lösung inkubiert. Mit Rücksicht auf die schwache Enzymaktivität des Gehirnes wurde die Abbaufähigkeit bei 1stündiger Inkubation geprüft.

Wie Abb. 2 zeigt, ergaben sich auch hier die beim Rind und beim Hund gefundenen großen Unterschiede des Substanz P-Gehaltes einzelner Teile. Verglichen damit war die Enzym-Aktivität des Hirnstammes in 2 dieser 3 Versuche nur um 50—60% höher als in den anderen Abschnitten. Doch enthielt auch das fast Substanz P-freie Kleinhirn (3—5 E/g) ebensoviel Enzymwirksamkeit wie das Rückenmark (26, 58, 94 E/g). Damit kann von einer nachweisbaren Korrelation zwischen Substanz P-Gehalt und Vorkommen Substanz P-abbauenden Enzyms kaum gesprochen werden.

Enzymaktivität von Rückenmarkswurzeln. Vorder- und Hinterwurzeln des Rindes wurden bei der Schlachtung entnommen, sofort auf 0° C gebracht und innerhalb von 3 Std zur Bereitung eines Enzym-Ansatzes verwendet. Bei halbstündiger Inkubation in der üblichen Weise ergab sich nur ein kaum feststellbarer Abbau, bei 3stündiger Inkubation betrug der Abbau bei Vorderwurzeln und Hinterwurzeln 33% (5 Versuche). Es konnte also auch in diesen Versuchen ähnlich wie im Zentralnervensystem des Kaninchens keine

Parallelität zwischen Substanz P-Gehalt und Abbaufähigkeit festgestellt werden.

Wenn man den Enzym-Ansatz 24 Std bei Zimmertemperatur oder bei 34° C stehen läßt, so kommt es meistens, aber nicht immer, zu einer Erhöhung der Abbaufähigkeit. Da solche Ansätze aber nicht mehr steril waren, lag die Vermutung nahe, daß es sich um die Mitwirkung von Bakterienenzymen handeln könnte.

Enzymatische Inaktivierung der Substanz P durch proteolytische Bakterienenzyme. Die mikroskopische Untersuchung eines Rohextraktes aus Rückenmarkswurzeln, welcher 24 Std bei 34° C gelagert worden war, ergaben massenhaft Streptokokken, Bac. faecalis alcaligenes und Bac. mesentericus. Diese Mischflora wurde auf Schräg-Agar-Röhrchen übertragen und der nach 48 Std entstandene Bakterienrasen mit

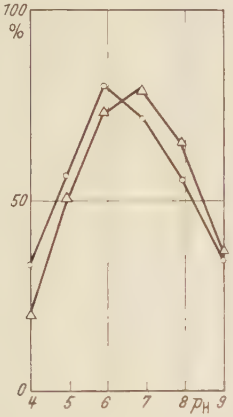


Abb. 3. Perzentueller Abbau der Substanz P bei p_H 4—9 durch Leber (○) und durch Niere (△) in 30 min

Abb. 4. Perzentueller Abbau der Substanz P bei verschiedenen Temperaturen durch Leber (○), Niere (△) und durch Pepsin (•) bei p_H 6,5 in 30 min

1 ml Kochsalzlösung abgespült, 30 min lang im eisgekühlten Glashomogenisator zerrieben und durch ein BERKEFELD-Filter filtriert. 0,05 ml des gelblichgrünen bakterienfreien Filtrates wurden mit 1 ml Substanz P-Lösung (73 E/ml) 30 min lang inkubiert. Der Bakterienrasen wurde in gleicher Weise zur Inkubation verwendet. Der Abbau mit dem Filtrat betrug 50%, mit der Bakterienaufschwemmung 10%. Demnach geht die Enzymwirkung vor allem auf Endofermente zurück.

Wenn Rückenmarkswurzel-Rohextrakte bei Raumtemperatur oder bei 34° C über 24 Std unter Zusatz von Nipasol bzw. Penicillin (500 E/ml) und Streptomycin (0,5 mg/ml) aufbewahrt wurden, war keine Steigerung der Enzymaktivität festzustellen. Daraus geht hervor, daß an dieser Aktivierung in erster Linie Bakterienenzyme beteiligt sein müssen und höchstens daneben geringgradig andere Faktoren, wie das vermehrte Heraustreten des Enzyms aus dem Gewebe, mitwirken.

Enzymaktivität von Leber und Niere bei verschiedenem p_H. Substanz P-Lösungen und Enzymansätze wurden in isotoner Natriumphosphatpufferlösung von p_H 4—9 bereitet und das p_H mit der Glaselektrode kontrolliert. Das Ergebnis der 30 min-Inkubation mit Leber und der 15 min-Inkubation mit Niere wird in Abb. 3 wiedergegeben, welche das Ergebnis von Versuchen über den gesamten Bereich zwischen p_H 4—9

darstellt. Bei Untersuchung der Enzymaktivität im engeren Bereich um die Maxima ergab die Leber ein Optimum von p_H 6,4—6,8, die Niere eines von p_H 7,6.

Enzymaktivität von Leber, Niere und Magenschleimhautextrakt bei verschiedener Temperatur. Abb. 4 zeigt die Inkubation von Substanz P mit Leber, Niere und Pepsinum pur. sol. DAB VI (Merck) bei p_H 6,5 für die Dauer von 15 min. Die Leber zeigte ein Optimum von 60° C, die Niere bei 55—60° C, das Pepsinpräparat von 60° C. Beim Magenschleimhaut-Präparat ist im Hinblick auf das p_H des Ansatzes diese Wirkung hauptsächlich auf das im Präparat enthaltene Kathepsin, welches ein Temperaturoptimum von etwa 60° C aufweist, zurückzuführen.

Hemmung der Enzymaktivität des Leberrohextraktes. Zu den üblichen Ansätzen von Substanz P mit Leberrohextrakt wurden zu Beginn der Inkubation folgende Substanzen in der Menge von 1 mg/ml zugesetzt: Prostigmin, Strychnin, Natriumcyanid, Natriumfluorid und Natriummonojodacetat. Damit sollte geprüft werden, ob Cholinesterasen am Abbau beteiligt sind, ob durch Strychnin eine Hemmung des Enzymabbaues zu finden ist, wie sie von Hellauer u. Umrath (1948) an der „*Erregungssubstanz sensibler Nerven*" gefunden wurde, ob Schwermetall-Aktivatoren nötig sind und ob glykogenolytische Enzyme mitwirken. Durch keinen der genannten Zusätze konnte eine Abbauhemmung erzielt werden.

Aktivität des Leberbreies unter Sauerstoff und unter Stickstoff. Sowohl die Substanz P-Lösung als auch die Enzym-Aufschwemmung wurden 20 min lang mit reinem Sauerstoff bzw. Stickstoff durchströmt und unter fortgesetztem Durchströmen der Gase in der üblichen Weise inkubiert. Unter Stickstoff betrug der Abbau durchschnittlich 79% (65—86%, 4 Versuche) des Abbaues unter Sauerstoff.

Extraktion des Enzymes aus Leber. Meerschweinchenleber wurde im Glashomogenisator zerrieben und mit Aceton getrocknet. Das Pulver wurde in einer dem verwendeten Frischlebergewicht entsprechenden Menge in Natriumphosphatpuffer aufgeschwemmt und nach Abzentrifugieren gröberer Teilchen zur Inkubation verwendet. Bei 30 min Inkubation konnte kein Abbau von Substanz P festgestellt werden.

Nach Waldschmidt-Leitz u. Deutsch (1927) wurde Meerschweinchenleber mit essigsaurem Glycerin extrahiert. Vom filtrierten Extrakt (5 ml aus 10,5 g Leber) wurden 0,5 ml zu einem Milliliter der Substanz P Lösung zugesetzt. Nach 30 min war ein Abbau um 47% zu sehen, was im Vergleich zu den Rohextrakten einer ziemlich starken Enzymwirksamkeit entspricht.

Abbau durch Magenschleimhautextrakt. In den handelsüblichen, aber auch in hochgereinigten Pepsinpräparaten ist Magenkathepsin enthalten, weshalb man von einer Pepsinwirkung nur dann sprechen kann,

wenn die Wirkungsoptima von Pepsin vorliegen (Buchs u. Freudenberg). Kathepsin kann durch Hemmung mit Uranylacetat ausgeschlossen werden.

Bei Inkubation von 36,5 E/ml Substanz P mit 0,5 mg/ml Pepsinum pur. sol. DAB VI (Merck) fand sich bei p_H 6,5 ein Temperaturoptimum von 60° C gegenüber dem Temperaturoptimum von Pepsin bei 50° C (Abb. 4). Die Inkubation bei verschiedenem p_H zeigt neben dem Maximum p_H 5 einen geringen Abbau bei p_H 3 und wieder höhere Werte bei p_H 1 und 2 (Abb. 5). Dies läßt annehmen, daß der Abbau bei einem solchen Pepsin-Präparat sowohl durch Pepsin als auch durch Kathepsin erfolgt, wobei letzterem Enzym bei höherem p_H praktisch die gesamte Wirkung zukommen dürfte. Dafür spricht vor allem, daß bei p_H 5 mittels 1 mg/ml Uranylacetat eine völlige Hemmung des Abbaues erzielt werden konnte.

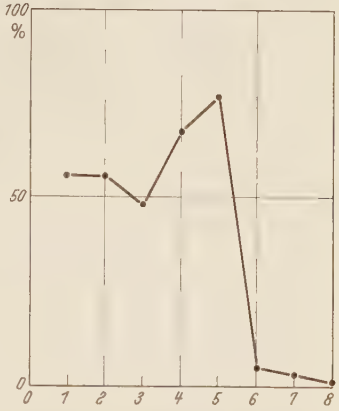


Abb. 5. Perzentueller Abbau der Substanz P durch Pepsin bei p_H 1—8 in 30 min

Abbau durch Papain. Zu den Versuchen wurde 0,5 mg/ml Papayotinum 1 : 100 Erg. B. 6 (Merck) verwendet, welches vor Verwendung mit 1 mg/ml Natriumcyanid aktiviert worden war. Bei Inkubation von 36.5 E ml Substanz P wurde in 15 min bei p_H 5 ein Abbau auf 70—80% erzielt; die nicht mit Cyanid aktivierte Kontrolle zeigte keinen Abbau. Durch 0,5 mg/ml Phenylhydrazin konnte der Abbau völlig gehemmt werden, was nach Bergmann u. Mitarb. (1937) darauf hindeutet, daß die Wirkung hauptsächlich auf Papain I zurückgeht.

Besprechung der Ergebnisse

Alle Untersuchungen über den enzymatischen Abbau der Substanz P haben zu berücksichtigen, daß dieselbe bisher noch nicht chemisch rein dargestellt worden ist. Eine Beeinträchtigung der Enzymwirkung etwa infolge „substrate competition" kann daher stattfinden. Deshalb sollte die vorliegende Untersuchung zunächst nur die wesentlichen Merkmale des Enzym-Abbaues erfassen.

Der Substanz P-Gehalt und die Enzym-Aktivität stehen in den einzelnen Organen in keinem unmittelbaren Zusammenhang. Die starke Aktivität in Milz, Niere und Leber deutet vor allem auf Endopeptidasen bzw. Kathepsin hin. Auch Vasopressin wird beispielsweise durch Leber und Niere enzymatisch abgebaut (Dicker u. Greenbaum, 1954).

Der Enzymgehalt in allen untersuchten Teilen des Zentralnervensystems ist demgegenüber nur verhältnismäßig gering.

Die Versuche zur Anreicherung des Enzymes aus Leber ergaben, daß im acetongetrockneten Pulver keine Wirksamkeit zu finden ist, was die Aminooxydase als abbauendes Enzym ausschließt (Blaschko, 1952). Hingegen waren saure Glycerinauszüge aus Leber, wie sie zur Extraktion von Kathepsinen verwendet wurden, wirksam.

Die Versuche zur Hemmung der Enzymwirkung des Leberbreies schließen aus, daß durch Schwermetalle aktivierte Enzyme, glykolytische Enzyme oder Cholinesterasen am Abbau beteiligt sind. Auch mit Strychnin erfolgte keine Abbauhemmung, wie sie Hellauer u. Umrath (1948) beim Abbau der „*Erregungssubstanz sensibler Nerven*" beschrieben haben. Daraus ist zu entnehmen, daß entweder die „*Erregungssubstanz*" nicht der Substanz P entspricht, oder daß das auf diese „*Erregungssubstanz*" wirkende Enzym von dem in der Leber vorkommenden und an Substanz P wirksamen Enzym verschieden ist.

Alle die Befunde lassen sich mit der Wirkung von Kathepsin in Einklang bringen. Eine nähere Klassifizierung nach Kathepsin I—V scheint jedoch nicht angebracht zu sein, da Hinweise für die Wirkung von mehreren Enzymen gefunden wurden und darüber hinaus schon von früheren Untersuchern auch die Wirkung anderer Enzyme wie z. B. Chymotrypsin beschrieben worden ist. Die weite Verbreitung von Enzymen, die auf Substanz P einwirken können, zeigt jedenfalls, daß dieser Umstand bei der Extraktion der Substanz P und damit unternommenen Versuchen zu berücksichtigen ist.

Wenn man versucht, auf Grund der bisherigen Ergebnisse anderer Autoren und aus den vorliegenden Befunden Anhaltspunkte über die chemische Konstitution der Substanz P zu gewinnen, so steht folgendes zur Verfügung:

1. Substanz P ist ein Polypeptid: Fällbar durch $^7/_{10}$-Sättigung mit Ammonsulfat, durch Eisessig-Äther, 95%iges Aceton, Pikrinsäure; enzymatischer Abbau durch Chymotrypsin, Trypsin, Pepsin, Papain, Kathepsin.

2. Es handelt sich um ein kleinmolekulares Polypeptid: Gute Löslichkeit in Wasser, Eisessig, 90%igem Äthanol, Aceton bis gegen 90%, Kochbeständigkeit bei p_H 1—7, Dialysierbarkeit durch Pergament oder Kollodium.

3. Ampholytische Natur: Bei der Elektrophorese zeigt sich eine anodische Wanderung bei p_H 7,1, eine kathodische bei p_H 6,4. Die Gegenstromverteilung in n-Butanol — n/5 NaOH ergibt eine Verteilung zugunsten des Butanols, was das Fehlen einer Carboxylgruppe annehmen läßt (Vogt 1955). Da die Aktivität der Substanz P durch Behandlung mit HNO_2 nicht zerstört wird, dürften freie Aminogruppen wohl kaum im Molekül vorhanden sein (Euler 1936). Für das Fehlen freier Aminogruppen spricht auch die selbst bei hochgereinigten Präparaten (etwa 3000 E/mg) nur ganz schwach rosa ausfallende Ninhydrin-Reaktion (Pernow 1953).

4. Neben diesen Hinweisen auf das Fehlen von freien Amino- und Carboxylgruppen läßt sich ferner aussagen: der Abbau durch Trypsin läßt auf Argininamid- oder Lysinamid-Gruppen im Molekül schließen. Thioglykolsäure führt nicht zu

einer Inaktivierung (Gaddum 1955); danach scheint im Molekül keine -S-S-Bindung vorzukommen bzw. die Aktivität der Substanz P nicht von deren Spaltung beeinflußt zu werden.

5. Der Enzymabbau war durch Eserin nicht zu hemmen, was das Vorkommen und die Spaltung einer Cholin-Ester-Bindung auszuschließen erlaubt. Acetongetrocknete Meerschweinchenleber, die gute Aminooxdase-Aktivität aufweist war ohne enzymatische Wirkung auf Substanz P; im Hinblick auf die Substratspezifität der Aminooxydase spricht dies gegen ein Vorkommen der Struktur $R—CH_2—NH_2$ im Molekül.

Zusammenfassung

Substanz P wird durch Rohextrakte folgender Organe verschieden rasch enzymatisch abgebaut: Niere, Milz > Leber, Pankreas, Ileum, Lunge > Placenta, Gehirn > Herz, Muskel > Blut. Die wirksamsten dieser Extrakte zerstören Substanz P in 10 min fast völlig.

In den untersuchten Organen sowie in einzelnen Abschnitten des Zentralnervensystems, welches durchwegs nur geringe Enzymwirkung besitzt, konnte keine erkennbare Beziehung zwischen dem jeweiligen Substanz P-Gehalt und der Enzymaktivität gefunden werden.

Vorkommen, p_H und Temperatur-Optima lassen erkennen, daß es sich meist um eine Kathepsin-Wirkung handelt. Im Magenschleimhautextrakt wirkt sowohl Pepsin als auch Kathepsin. Auch Papain baut die Substanz P ab. Ferner konnte ein rascher Abbau durch proteolytische Bakterienenzyme nachgewiesen werden.

Eine Beteiligung von Cholin-Esterasen, Aminooxydase, glykolytischen oder schwermetallaktivierten Enzymen am Abbau wurde nicht gefunden.

Literatur

Bergmann, M., J. S. Fruton and H. Fraenkel-Conrat: J. of Biol. Chem. **119**, 35 (1937). — Blaschko, H.: Pharmakol. Rev. **4**, 415 (1952). — Buchs, S., u. F. Freudenberg: vgl. B. Flaschenträger: Physiologische Chemie, Band I, S. 1144. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951. — Chang, H. C., and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **79**, 255 (1933). — Dicker, S. E., and A. L. Greenbaum: J. of Physiol. **126**, 116 (1954). — Euler, U. S. v.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 181 (1936). — Gaddum, J. H.: Polypeptides which stimulate plain muscle. Edinburgh u. London: E. & S. Livingstone Ltd. 1955 — Gaddum, J. H.: (1955) persönliche Mitteilung. — Gaddum, J. H., and H. O. Schild: J. of Physiol. **83**, 1 (1934). — Gullbring, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **6**, 246 (1943). — Hellauer, H., u. K. Umrath: Pflügers Arch. **249**, 619 (1948). — Holton, F. A., and P. Holton: J. of Physiol. **118**, 310 (1952); **126**, 124 (1954). — Lembeck, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 197 (1953). — Pernow, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, Suppl. 105 (1953). — Pernov, B.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **7**, 59 (1955). — Umrath, K.: Pflügers Arch. **258**, 230 (1953). — Vogt, W.: Naturwissenschaften **42**, 607 (1955). — Waldschmidt-Leitz, E., u. W. Deutsch: Hoppe Seylers Z. **167**, 285 (1927).

Dr. O. Eber u. Doz. Dr. F. Lembeck, Graz/Österreich, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 148—151 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens)

Wirkungsunterschied zwischen den Polypeptiden Bradykinin und Substanz P am Zentralnervensystem*

Von

Gerhard Zetler

(Eingegangen am 16. April 1956)

Bradykinin und Substanz P sind pharmakologisch aktive Polypeptide, die trotz großer Ähnlichkeit wohl nicht miteinander identisch sind. Während sich die beiden Substanzen bei der Anwendung moderner biochemischer Methoden deutlich voneinander unterscheiden (Pernow u. Rocha e Silva, 1955; Vogt, 1955), sind die bisher bekannten pharmakologischen Unterschiede nur gering. Beide Polypeptide senken den Blutdruck des atropinisierten Kaninchens und bringen isolierte Darmstreifen zur Kontraktion. Nach Pernow u. Rocha e Silva (1955) ist die Wirkung auf den Blutdruck bei Substanz P stärker als bei Bradykinin, die Kontraktion isolierter Darmpräparate und ihre Erschlaffung nach der Kontraktion tritt nach Bradykinin langsamer ein als nach Substanz P; an verschiedenen isolierten Darmpräparaten wirken die beiden Polypeptide mit verschiedener Stärke; so ist das Rectalcaecum der Henne für Substanz P viel empfindlicher als für Bradykinin.

Substanz P besitzt eine erhebliche Wirkung auf das Zentralnervensystem (Zetler, 1956). Es blieb die Frage, ob dies auch bei Bradykinin der Fall ist.

Material und Methodik

Unser Substanz P-Präparat hatte eine Aktivität von 12 E/mg (Fraktion SPG_{AC} unserer vorangegangenen Mitteilung: Zetler, 1956) und war aus Rinder-Gehirn hergestellt worden. Bradykinin bereiteten wir in Anlehnung an Prado, Beraldo u. Rocha e Silva (1950): Aus 199 ml menschlichen Blutplasmas wurden durch 50%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat die Globuline gefällt, gelöst und erneut in gleicher Weise gefällt, getrocknet und nach dem Verfahren von Behrens u. Seydl (1951) entsalzt; wir erhielten 19 mg Globulinpulver pro Milliliter Plasma (vor dem Entsalzen 46 mg/ml), somit insgesamt 3,8 g. 3,5 g Globulinpulver lösten wir in 150 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, sowie 100 mg Trypsin (kristallisiertes Präparat der Firma

* Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Worthington Chemical Sales Co., Freehold, New Jersey) in 100 ml NaCl-Lösung. Beide Lösungen wurden auf 37° C erwärmt, zusammengegossen, unter häufigem Rühren 8 min bei 37° C gehalten und danach in die doppelte Menge siedenden Äthanols gegossen. Nach 5 min langem Kochen und anschließendem Abkühlen wurde filtriert, das Filtrat im Vakuum eingeengt, das Konzentrat gefriertrocknet. Das trockene Material extrahierten wir zweimal mit Eisessig und fällten die vereinigten Extrakte mit Äther. Das Präcipitat wurde zweimal mit Äther gewaschen, getrocknet und stellte das endgültige Bradykinin-Präparat dar (Ausbeute 328 mg).

Die biologische Aktivität dieses Bradykinins bestimmten wir am isolierten Ileum des Meerschweinchens nach der Methode von Feldberg u. Toh (1953). Als Standard diente unser Substanz P-Präparat SPG $_c$. 1 mg Bradykinin hatte die gleiche Aktivität wie 12,2 E Substanz P; die beiden miteinander verglichenen Polypeptide waren also am Ileum des Meerschweinchens praktisch von gleicher Wirksamkeit.

Wegen der geringen Bradykinin-Menge benutzten wir männliche Mäuse im Gewicht von 15—17 g, die wir vom Tierhändler kauften. Die verabreichten Substanzen waren in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst. Bulbocapnin wurde intraperitoneal, alle anderen Substanzen subcutan injiziert, und zwar bei den Harmin-Versuchen an getrennten Stellen des Rückens. Die insgesamt verabreichte Flüssigkeitsmenge betrug immer 0,02 ml/g.

Die Bulbocapnin-Katatonie und ihre Beeinflussung durch unsere Substanzen beurteilten wir auf die früher beschriebene Weise (Zetler, 1956).

In noch nicht veröffentlichten Versuchen hatte sich uns zur Registrierung des Harmin-Tremors der Maus eine Modifikation unserer Apparatur (Zetler, 1956) bewährt, die darin besteht, daß der Faden vom Kästchen direkt horizontal zum Arbeitssammler geführt wird, wodurch die Umleitung des Fadens über eine Rolle wegfällt. Die Empfindlichkeit der Apparatur wird dadurch erhöht. In den gleichen Versuchen hatte sich gezeigt, daß der Tremor zwischen der 8. und der 16. min nach der subcutanen Injektion von 7 mg kg Harmin am stärksten ist. Aus diesen Gründen registrierten wir bei den zu schildernden Versuchen den Tremor mit der modifizierten Apparatur nur während dieser Zeit. Als Maß der Intensität des Tremors dient die Anzahl von Kontakten des Arbeitssammlers in der Zeit von der 8. bis zur 16. min nach der Harmin-Injektion. Gleichzeitig mit Harmin wurden die zu prüfenden Stoffe injiziert.

Bei der statistischen Verarbeitung der Resultate richteten wir uns nach Gaddum (1953). Wir nahmen an, daß bei $p > 0{,}05$ kein echter Unterschied zwischen zwei Mittelwerten vorhanden ist.

Herrn Doz. Dr. R. Hotovy, Darmstadt sei für die freundliche Überlassung von Harmin und Bulbocapnin bestens gedankt.

Ergebnisse und Diskussion

In unserer vorangegangenen Arbeit (Zetler, 1956) hatten wir unter anderem beschrieben, daß Substanz P die Wirksamkeit von Harmin vermindert, diejenigen von Bulbocapnin jedoch verstärkt. Die neuen Ergebnisse, die in Tab. 1 u. 2 zusammengefaßt sind, bestätigen dies. Sie zeigen weiter, daß Bradykinin das Zentralnervensystem nicht beeinflußt. Dieser drastische Unterschied zwischen Substanz P und Bradykinin bekräftigt die Ansicht von Pernow u. Rocha e Silva (1955) sowie von Vogt (1955), daß Substanz P und Bradykinin zwei verschiedene Substanzen sind. Die Wirkung von Substanz P auf das

Zentralnervensystem ist also für dieses Polypeptid charakteristischer als seine Wirkungen am Darm oder am Blutdruck, die man bekanntlich — von geringfügigen Varianten abgesehen — auch bei Bradykinin und einigen anderen Polypeptiden findet (s. Gaddum, 1955). Man kann wohl auch vermuten, daß diejenigen Teile des Substanz P-Moleküls, die die Darm- und Blutdruck-Wirksamkeit bestimmen, nicht identisch sind mit der Konfiguration, auf der die Affinität zum Zentralnervensystem beruht.

Tabelle 1. *Beeinflussung des Harmin-Tremors der weißen Maus durch 1 mg/g Substanz P und durch 1 mg/g Bradykinin.*

Die Zahlen bedeuten die Anzahl der Kontakte des Arbeitssammlers in der Zeit von der 8. bis zur 16. min nach der Harmin-Injektion

	NaCl-Lösung	Substanz P	Bradykinin
	27	6	40
	35	5	25
	41	4	29
	18	17	17
	28	3	4
	35	10	33
	11	6	13
	13	15	21
	7	2	17
	17	5	9
Mittelwert:	20,2	5,96	17,5
Grenzen des mittleren Fehlers des Mittelwertes:	16,89—24,25	4,81—7,38	14,07—21,64
p.		$< 0{,}001$	$> 0{,}6$

Tabelle 2. *Beeinflussung der Wirksamkeit von 15 mg/kg Bulbocapnin bei der weißen Maus durch 1 mg/g Substanz P und durch 1 mg/g Bradykinin.*

Die Zahlen bedeuten die Anzahl positiver Beobachtungsresultate[1]

	NaCl-Lösung	Substanz P	Bradykinin
	3	10	3
	1	8	2
	4	6	10
	10	14	3
	3	6	4
	2	13	2
	5	9	3
Mittelwert:	3,2	9,0	3,3
Grenzen des mittleren Fehlers des Mittelwertes:	2,46—4,25	7,92—10,17	3,1—3,53
p.		$< 0{,}01$	$> 0{,}9$

[1] Multipliziert man diese Zahlen mit 5, so erhält man die ungefähre Dauer der Katatonie in Minuten (siehe Zetler, 1956).

Zusammenfassung

Substanz P vermindert bei weißen Mäusen den Harmin-Tremor und verstärkt die Bulbocapnin-Katatonie. Bradykinin war in dieser Hinsicht ohne Wirkung. Bradykinin beeinflußt demnach das Zentralnervensystem nicht und ist nicht mit Substanz P identisch.

Literatur

Behrens, M., u. G. Seydl: Arzneimittel-Forsch. **1**, 228 (1951). — Feldberg, W., and C. C. Toh: J. of Physiol. **119**, 352 (1953). — Gaddum, J. H.: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **5**, 345 (1953). — „Polypeptides which stimulate plain muscle", Edinburgh and London 1955. — Pernow, B., and M. Rocha e Silva: Acta physiol. scand. (Stockh.) **34**, 59 (1955). — Prado, E. S., W. T. Beraldo and M. Rocha e Silva: Arch. of Biochem. **27**, 410 (1950). — Vogt, W.: Naturwissenschaften **42**, 607 (1955). — Zetler, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 513 (1956).

Doz. Dr. G. Zetler, Kiel, Pharmakol. Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 152—160 (1956)

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Szeged/Ungarn
(Direktor: Prof. Dr. I. Gy. Fazekas)

Mineralocorticoid in der Muskulatur bei normalen sowie hypertrophischen Nebennieren

Von

I. Gy. Fazekas

(Eingegangen am 17. April 1956)

Nach bisheriger Auffassung sollen die Nebennierenrindenhormone im Organismus „rasch inaktiviert" werden. Diese Inaktivierung wird mit ihrem Abbau und ihrer Ausscheidung erklärt. Nach einigen Forschern[17, 25] werden die Rindenhormone durch die Leber abgebaut, nach anderen hingegen[1–3, 13, 21, 27] baut sie die Leber nicht ab. Im Laufe unserer neueren Untersuchungen wurde klargestellt, daß: 1. die Leber[11, 13] und die Muskulatur[12, 14] von Kaninchen mit normalen und hypertrophischen Nebennieren — im Gegensatz zu den bisherigen Meinungen — *Glucocorticoide* speichert und zwar letztere Tiere in größerem Maße; 2. die Leber von Kaninchen mit normalen bzw. hypertrophischen Nebennieren außerdem in gleichem Maße auch noch *Mineralocorticoide* speichert[16]; 3. adrenalektomierte Mäuse mit Leberextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren am Leben gehalten werden können[10]. — Es schien nun wünschenswert aufzuklären, ob auch die Muskulatur Mineralocorticoide speichert, und wenn ja, ob es einen Unterschied zwischen Muskulatur von Kaninchen mit normalen und hypertrophischen Nebennieren in dieser Hinsicht gibt oder nicht.

Unter dem Einfluß des aus der Nebennierenrinde gewonnenen bzw. auf synthetischem Wege hergestellten Desoxycorticosterons (= Mineralocorticoid) steigt der Serum-Na-Gehalt von gesunden Menschen und Addison-Kranken sowie von normalen und adrenalektomierten Tieren an, der K-Gehalt nimmt hingegen ab[6, 23, 24, 26, 31–33]. Auf Grund dieser Tatsache wurde, um die oben gestellte Frage beantworten zu können, aus der *Muskulatur* von Kaninchen mit normalen und hypertrophischen Nebennieren ein Extrakt hergestellt und der Einfluß dieses Extraktes auf den Serum-Na- und -K-Gehalt von gesunden Kaninchen untersucht.

Der Muskelextrakt wurde mittels der Methode von Swingle u. Pfiffner[29, 30] (Methode für Herstellung von Nebennierenrindenextrakt) hergestellt. Die Na-Bestimmungen wurden nach Rourke[28], die K-Bestimmungen nach Kramer u. Tisdall[22] aus dem Blutserum der Ohrenrandvene der Kaninchen durchgeführt.

1. 20 weibliche und männliche, geschlechtsreife Kaninchen von 2700—3000 g Anfangsgewicht und gleicher Rasse (Chinchilla) wurden, 6 Monate hindurch, mit Hafer, trockenem Klee und Wasser ernährt. Aus der Muskulatur dieser Kaninchen wurde der normale Muskelextrakt hergestellt. — Während derselben 6 Monate

wurden andere 54 weibliche und männliche Kaninchen von 2500—3000 g Anfangsgewicht und gleicher Rasse (Chinchilla) in Gruppen mit je 6 Tieren geteilt und bei gleicher Ernährung mit acidotisch wirkenden Verbindungen behandelt, von denen schon früher behauptet wurde, daß durch ihre Verabreichung eine Hypertrophie und gesteigerte Funktion der Nebennierenrinde erzielt werden kann[7, 9]. — Folgende Verbindungen wurden verwendet: Ammoniumchlorid (3×6 Tiere), -hydroxyd, -sulfat, Natriumdihydrophosphat, Calciumchlorid, Acidum lacticum und aceticum (je 6 Tiere). — Jede Tiergruppe bekam, 20 Tage hindurch, zweitägig, in allmählich zunehmenden Dosen, 0,1—0,2 g Verbindung pro 1 kg Körpergewicht, ins Futter gemischt. — Nach 20 Tage Behandlung wurde immer eine behandlungsfreie Periode von 10 Tagen eingeschaltet. Nach 6 Monaten wurden so die behandelten wie die Kontroll-Kaninchen ohne Behandlung durch Luftembolie getötet, ihre Nebennieren gewogen, aus der frisch losgetrennten Muskulatur ein Extrak hergestellt.

Das Gewicht beider Nebennieren betrug bei den behandelten Tieren 65—109 cg, im Mittelwert 84 cg (mittlerer Fehler ± 1,87), bei den nichtbehandelten Kontrollkaninchen aber 30—57 cg, im Mittelwert 46 cg (mittlerer Fehler ± 1,34). Das Nebennierengewicht betrug also bei den behandelten Kaninchen um 38 cg, das ist um 82,6% mehr als bei den nichtbehandelten Kontrolltieren.

2. Aus der insgesamt 21,5 kg schweren Muskulatur der 20 nichtbehandelten Kontrollkaninchen und der insgesamt 66,2 kg schweren Muskulatur der 54 behandelten Kaninchen wurde ein Extrakt hergestellt, in dessen 1 cm³ sich eine 100 g Muskulatur entsprechende Wirkstoffmenge befand. — Der Extrakt ist in 96—70%igem Alkohol, in Benzol, Aceton gut löslich, in Petroläther aber unlöslich, enthält kein Eiweiß, keine Fette, Fettsäuren, kein Cholesterin. Die Zimmermannsche 17-Ketosteroid-Reaktion[34, 35] nach Callow[4], die mit je 1 cm³ Muskelextrakt von Kaninchen mit normalen bzw. hypertrophischen Nebennieren durchgeführt worden ist, fiel, nach vorschriftsmäßiger Ausschüttlung mit Äther, negativ aus. Unmittelbar eingemessen und ohne Ausschüttlung mit Äther war in 0,2 cm³ Muskelextrakt von nichtbehandelten Kaninchen eine Farbenreaktion nachzuweisen, die 0,5 mg 17-Ketosteroiden entsprach. Entsprechende Rechnung ergab, daß 1 kg normale Kaninchenmuskulatur 25 mg solchen Stoffes enthält, der eine gleiche Farbenreaktion zur Folge hat wie das 17-Ketosteroid. — Die genaue Bestimmung dieses Stoffes (dieser Stoffe) wäre nur durch chemische Analyse möglich. In 0,2 cm³ Muskelextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren war hingegen eine 1,0 mg, in 1 cm³ 5,0 mg (= 100 g Muskulatur), in 1 kg Muskulatur also 50 mg 17-Ketosteroid entsprechende Farbenreaktion nachzuweisen, also noch einmal soviel wie in der normalen Muskulatur.

Zwecks Konservierung wurde zu den Extrakten 0,01% Acidum benzoicum gegeben, dann wurde der Extrakt in Ampullen gefüllt, im Kühlschrank bei konstanter Temperatur von + 2° C aufbewahrt.

Tabelle 1. *Einfluß des Muskelextraktes von normalen Kaninchen auf den Serum-Na- und K-Gehalt von Kaninchen*

Tier	Körpergewicht in	Muskelextraktmenge in cm³ pro	Serum-Na in mg-%				Maximale Zunahme			Serum-K in mg-%				Maximale Abnahme		
			vor	½ Std nach	1 Std nach	2 Std nach	in Std	mg-%	%	vor	½ Std nach	1 Std nach	2 Std nach	in Std	mg-%	%
Nr.	g	100 g	der Behandlung							der Behandlung						
1.	2600	0,3	367	376	*384*	380	1	+ 17	4,6	17,34	17,11	*17,00*	17,22	1	— 0,34	— 1,96
2.	2100	0,3	340	360	*362*	341	1	+ 22	6,4	17,61	17,05	*17,09*	17,09	1	— 0,52	— 2,94
3.	2100	0,3	332	337	*348*	339	1	+ 16	4,8	18,62	18,42	*18,40*	18,60	1	— 0,22	— 1,18
4.	2200	0,3	337	340	*354*	342	1	+ 17	5,0	18,21	18,19	18,16	18,18	1	— 0,05	— 0,27
5.	2000	0,3	335	342	*353*	346	1	+ 18	5,2	18,17	18,08	*17,94*	18,03	1	0,23	— 1,25
Mittelw.:		0,3	342	351	360	348	1	+ 18	*5,2*	17,99	17,77	17,71	17,82	1	— 0,28	— 1,61
6.	2100	0,6	327	335	*369*	340	1	+ 42	12,8	18,12	18,01	*17,82*	18,06	1	— 0,30	— *1,65*
7.	2250	0,6	330	354	*373*	345	1	+ 43	13,0	17,97	17,84	*17,41*	17,80	1	— 0,56	— 3,11
8.	2200	0,6	348	*378*	*389*	370	1	+ 41	11,7	18,59	18,32	*18,13*	18,29	1	— 0,46	— 2,46
9.	2250	0,6	340	366	*382*	370	1	+ 42	12,3	18,23	17,92	*17,74*	17,96	1	— 0,49	— 2,68
10.	2150	0,6	338	362	*384*	365	1	+ 46	13,6	18,80	18,50	*18,15*	18,42	1	— 0,65	— 3,45
Mittelw.:		0,6	336,6	359	379,4	356	1	+ 42,8	*13,0*	18,34	18,31	17,85	18,10	1	— 0,49	— *2,67*

Vor subcutaner Verabfolgung wurden die Extrakte im Wasserbad auf 25° C erwärmt.

3. In einer anderen Arbeit[16] wurde darauf hingewiesen, daß sich der Serum-Na- und -K-Gehalt von gesunden Kaninchen — in Zeitabständen von 0, 5, 10, 20, 30, 60 und 120 min untersucht — im Verhältnis zum Anfangswert nicht ändert. Nur wenn man über diese Tatsache im klaren ist, können die durch die Verabreichung von Desoxycorticosteronacetat (DOCA) oder aber durch die Einspritzung von Muskelextrakt bedingten Serum-Na- und -K-Veränderungen gewertet werden.

4. In früheren Untersuchungen[16] wurde nachgewiesen, daß die i.m. Verabreichung von 0,02 mg DOCA (N. V. Organon-Oss-Holland, 1 cm³ = 10 mg $C_{21}H_{30}O_5$) pro 100 g Körpergewicht das Serum-Na von Kaninchen in 2—4 Std um 19 bis 30 mg-%, im Mittelwert um 21,0 mg-% (6,8%) vermehrt, den Serum-K-Gehalt aber um 0,42—1,24 mg-%, im Mittelwert um 0,63 mg-% (3,9%) vermindert. Unter dem Einfluß der DOCA-Dosis von 0,04 mg/100 g zeigte sich während 2 bis 4 Std eine Serum-Na-Vermehrung von 28—37 mg-%, im Mittelwert von 30 mg-% (9,8%), und eine Serum-K-Abnahme von 1,25—3,48 mg-%, im Mittelwert von 1,97 mg-% (12,5%). Nach Verabreichung von 0,10 mg DOCA pro 100 g Körpergewicht stieg das Serum-Na in 4 Std um 89—95 mg-%, im Mittelwert um 91 mg-% (28,3%) an, das Serum-K nahm aber um 3,73—5,36 mg-%, im Mittelwert um 4,3 mg-% (21,8%) ab. — Diese Angaben sind bei Auswertung der Wirksamkeit der Muskelextrakte von Bedeutung.

5. Vor und ½, 1, 2 Std nach subcutaner Einspritzung von 0,3 bis 0,6 cm³ Muskelextrakt von normalen nichtbehandelten Kontrollkaninchen wurde der Serum-Na- und -K-Gehalt bei 10 männlichen Kaninchen von gleicher Rasse (Chinchilla) untersucht (Tab. 1).

Die Angaben der Tab. 1 zeigen, daß der Muskelextrakt von normalen Kaninchen einen Stoff enthält, der — in geradem Verhältnis zur Dosisgröße — den Serum-Na-Gehalt von gesunden Kaninchen ausgesprochen vermehrt, den Serum-K-Gehalt nur mäßig vermindert, aber niemals erhöht. Unser Muskelextrakt beeinflußt also den Serum-Na-Gehalt auf gleiche Weise wie das Mineralocorticoid der Nebennierenrinde bzw. das Desoxycorticosteronacetat (DOCA). Auf Grund seiner chemischen und biologischen Eigenschaften halten wir diesen Stoff unseres Muskelextraktes mit dem Mineralocorticoid der Nebennierenrinde für identisch, was also bedeutet, daß die Muskulatur von normalen Kaninchen außer den darin früher nachgewiesenen Glucocorticoiden auch Mineralocorticoide enthält (speichert).

6. Danach wurde die Wirkung des Muskelextraktes von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren auf den Serum-Na- und -K-Gehalt von 10 gesunden Kaninchen mit 2600—3000 g Körpergewicht untersucht. Die Na- und K-Werte wurden unmittelbar vor der Behandlung sowie ½, 1, 2, 4 Std nach Verabreichung von 0,2—0,3 cm³ Muskelextrakt pro 100 g Körpergewicht bestimmt (Tab. 2).

Unter dem Einfluß von 0,2 cm³ Muskelextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren pro 100 g Körpergewicht zeigte

Tabelle 2. *Einfluß des Muskelextraktes von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren auf den Serum-Na- und -K-Gehalt von Kaninchen*

Tier	Körpergewicht in	Muskelextraktmenge in cm³ pro	Serum-Na in mg-%					Maximale Zunahme			Serum-K in mg-%					Maximale Abnahme		
			vor	½ Std nach	1 Std nach	2 Std nach	4 Std nach	in Std	mg-%	%	vor	½ Std nach	1 Std nach	2 Std nach	4 Std nach	in Std	mg-%	%
Nr.	g	100 g	der Behandlung								der Behandlung							
1.	2900	0,2	338	343	*356*	350	337	1	18	5,30	14,68	14,44	14,14	14,28	14,48	1	— 0,54	— 3,46
2.	2750	0,2	353	354	*360*	*373*	365	2	20	5,66	17,99	17,85	17,30	17,40	17,71	1	— 0,69	— 3,83
3.	3000	0,2	348	350	*369*	353	340	1	21	5,14	15,92	15,52	*15,35*	15,27	15,52	2	— 0,25	— 1,63
4.	2800	0,2	342	347	358	349	350	1	16	4,67	16,08	15,87	*15,57*	16,14	16,11	1	— 0,51	— 3,17
Mittelwert:			345	348	361	356	348	—	19	5,13	16,17	15,92	15,59	15,77	15,95	—	— 0,49	— 3,02
5.	3000	0,3	335	339	341	*373*	343	2	38	11,34	15,24	14,66	*14,07*	14,14	15,17	1	— 1,17	— 7,98
6.	2800	0,3	336	365	362	*386*	345	2	50	14,88	15,86	15,86	*15,38*	*14,83*	15,59	2	— 1,03	— 6,49
7.	2800	0,3	310	347	*353*	345	309	1	43	13,87	16,92	16,54	16,74	*16,42*	16,64	2	— 0,50	— 2,95
8.	2850	0,3	331	345	*368*	340	338	2	37	11,17	15,94	15,87	15,87	*15,52*	15,73	2	— 0,42	— 2,63
9.	2600	0,3	335	356	361	*369*	336	2	34	10,15	16,62	16,76	15,87	*15,80*	16,55	2	— 0,82	— 4,93
10.	2600	0,3	340	358	375	354	340	1	35	10,29	14,28	14,15	*13,26*	13,74	14,20	1	— 1,02	— 7,14
Mittelwert:			331	351	360	361	335	—	39,5	11,95	15,81	15,64	15,19	15,07	15,64	—	— 0,82	— 5,35

sich, in jedem Fall, ein gewisser Anstieg im Serum-Na bei gleichzeitiger mäßiger Abnahme des Serum-K-Gehaltes. Die maximale Na-Vermehrung betrug im Mittel 19 mg-%, die maximale K-Verminderung 0,49 mg-%.

Die Muskelextraktdosis von 0,3 cm³ pro 100 g Körpergewicht vermehrte allmählich den Serum-Na-Gehalt von Kaninchen dermaßen, daß der maximale Na-Anstieg nach 1—2 Std im Mittel 39,5 mg-% betrug. Zu gleicher Zeit nahm das Serum-K im Mittel um 0,82 mg-% ab.

Aus den Angaben der Tab. 2 geht hervor, daß *der Muskelextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren den Serum-Na-Gehalt von gesunden Kaninchen*, in geradem Verhältnis zur Dosisgröße, *vermehrt, den K-Gehalt aber mäßig vermindert*. Der Muskelextrakt bzw. die Muskulatur von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren enthalten also einen dem Mineralocorticoid der Nebennierenrinde (Desoxycorticosteron) gleich wirkenden Stoff. Dieser Wirkstoff wird, auf Grund seiner chemischen und biologischen Eigenschaften mit dem Mineralocorticoid der Nebennierenrinde für identisch gehalten.

Vergleicht man die Wirkung des Muskelextraktes von normalen Kaninchen und von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren miteinander, so kann behauptet werden, daß 0,6 cm³ normalen Muskelextraktes pro 100 g Körpergewicht das Serum-Na beinahe in gleichem Maße steigert wie 0,3 cm³ Muskelextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren. In der Muskulatur von Kaninchen, deren Nebennieren infolge acidotischer Behandlung hypertrophierten, wird also um 100% mehr (d. h. noch einmal soviel) Mineralocorticoid gespeichert als in der gleichen Muskelmenge von normalen Kaninchen. Das steht in vollem Einklang mit unserer früheren Behauptung, daß nämlich die Muskulatur von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren mehr Glucocorticoide enthält (speichert)[14] als die normale Kaninchenmuskulatur[12].

Vergleicht man die auf das Serum-Na ausgeübte Wirkung des Muskelextraktes von Kaninchen mit normalen bzw. hypertrophischen Nebennieren mit der gleichen Wirkung des DOCA, so stellt sich heraus, daß der Einfluß von beinahe 0,05 mg DOCA pro 100 g Körpergewicht dem Einfluß von 0,6 cm³ normalen Muskelextraktes bzw. von 0,3 cm³ Muskelextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren entspricht. Rechnung ergab, daß im Extrakt von 1 kg normaler Muskulatur 0,83 mg, in 1 kg Muskulatur von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren aber etwa 1,7 mg DOCA entsprechender Wirkstoff (Mineralocorticoid) vorzufinden ist. Nach KENDALL[20] enthalten 500 kg Rindennebenniere 1550 mg Gesamtrindensteroide, darin ist aber das Desoxycorticosteron nur in unbedeutender Menge vorhanden. Auf Grund dieser Angabe muß

der von uns gefundene Mineralocorticoid-Wert für auffallend hoch gehalten werden. Die durch die Zimmermannsche 17-Ketosteroid-Reaktion gewonnenen Zahlen (bei normalem Muskelextrakt: 25 mg-%, beim Muskelextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren: 50 mg-%) können also nicht ausschließlich von den in der Muskulatur befindlichen Glucocorticoiden und Mineralocorticoiden herstammen, sondern mit aller Gewißheit, auch durch andere Steroide bzw. Reduktionsstoffe bedingt sein.

Nach Cavalli u. Mitarb.[5] behält die normale Froschmuskulatur in physiologischer Kochsalzlösung ihr Gewicht auf konstante Weise, das Gewicht der Muskulatur von adrenalektomierten Tieren vermehrt sich aber durch Wasseraufnahme, was durch DOCA-Zufuhr verhindert werden kann. Dieser Versuch weist unseres Erachtens — obwohl nur mittelbar — darauf hin, daß in der normalen Muskulatur eine gewisse DOCA-Menge vorhanden sein muß. (Durch die jetzige Untersuchungen wurde das nun bestätigt.) — In früheren Untersuchungen[9] wurde nachgewiesen, daß der Wassergehalt in der Muskulatur von Gänsen bzw. Schweinen, deren Nebennieren infolge NH_4Cl-Behandlung hypertrophierten, um 1,60 bzw. 1,09% weniger betrug als der Wassergehalt in der Normalmuskulatur der entsprechenden Kontrolltiere. Das steht im Einklang mit der jetzigen Angabe, daß nämlich der Mineralocorticoid-(DOCA)-Gehalt in der Muskulatur von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren höher ist als in der Normalmuskulatur. — Unsere vorliegenden Untersuchungen sind auch vom Gesichtspunkt der Physiologie der Muskelarbeit bzw. der Arbeitsleistung aus beachtenswert. Sie weisen einerseits darauf hin, daß, im Falle von Hypertrophie und gesteigerter Funktion der Nebennierenrinde (infolge acidotischer Behandlung) in der Muskulatur mehr Mineralo- und Gluco-corticoid gespeichert wird, andererseits stellen sie eine ausreichende Erklärung für die Beobachtung[15] dar, daß nämlich durch die Behandlung mit NH_4Cl die Müdigkeit von Menschen verringert, ihre Arbeitsfähigkeit aber erhöht werden konnte. — Das stimmt auch mit der Behauptung von Ingle[19] überein, daß die Rindensteroide die Arbeitsfähigkeit der Muskulatur steigern. Es wäre nun wünschenswert, diese Frage so an Menschen (z. B. an Sportlern) wie an Tieren auf experimentelle und exakte Weise zu untersuchen.

Zusammenfassung

1. Aus der Muskulatur von Kaninchen mit normalen bzw. hypertrophischen Nebennieren (infolge acidotischer Behandlung!) wurde an Hand der Methode von Swingle u. Pfiffner (Methode für Herstellung von Nebennierenrindenextrakt) ein 100fach konzentrierter Extrakt gewonnen.

2. Die nach Callow durchgeführte Zimmermannsche 17-Ketosteroid-Reaktion fiel mit dem Muskelextrakt von Kaninchen mit normalen bzw. hypertrophischen Nebennieren negativ aus; ohne Ausschüttlung mit Äther und unmittelbar zeigte aber die Reaktion, daß 1 kg Muskulatur von normalen Kaninchen 25 mg, von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren 50 mg solchen Stoffes enthält, der eine gleiche Farbenreaktion ergibt wie die 17-Ketosteroide.

3. Das Gesamtgewicht der Nebennieren bei den mit acidotischen Verbindungen behandelten Kaninchen betrug um 82,6% mehr als bei den normalen Kontrollkaninchen.

4. Der Muskelextrakt von Kaninchen mit normalen bzw. hypertrophischen Nebennieren vermehrte den Serum-Na-Gehalt von gesunden Kaninchen, und zwar in geradem Verhältnis zur Dosisgröße, und verminderte den K-Gehalt auf gleiche Weise wie das anderen Kontrollen verabreichte Desoxycorticosteronacetat.

5. Der Muskelextrakt von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren erhöhte das Serum-Na-Niveau bzw. verminderte den Serum-K-Gehalt um 100% in größerem Maße als die gleiche Menge normalen Muskelextraktes. Das weist darauf hin, daß die Muskulatur von Kaninchen mit hypertrophischen Nebennieren etwa um 100% mehr von dem den Na- und K-Stoffwechsel regulierenden Wirkstoff enthält.

6. Auf Grund der chemischen und biologischen Eigenschaften halten wir diesen Stoff für identisch mit dem Mineralocorticoid der Nebennierenrinde.

7. Die Muskulatur enthält (speichert) also nicht nur Glucocorticoide (wie früher nachgewiesen wurde), sondern auch Mineralocorticoide.

Literatur

[1] Bernstein, D. E.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **73**, 175 (1950). — [2] Bernstein, D. E., and I. Enoch: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 215 (1951). — [3] Butcher, E. O.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **43**, 30 (1948). — [4] Callow, N. H.: J. of Endocrin. **1**, 76 (1939). — [5] Cavalli, F., and E. Oechialini: Biochimica e. Ter. sper. **27**, 262 (1940). — [6] Clinton jr., M., and G. V. Thorn: Bull. Johns Hopkins Hosp. **72**, 255 (1943). — [7] Fazekas, I. Gy.: Endokrinologie **21**, 315 (1939). — Magyar Orvosi Arch. **40**, 256 (1939). — Orvosi Hetil. **1938**, 507. — [8] Fazekas, I. Gy.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 165 (1941). — Magyar Orvosi Arch. **42**, 155 (1941). — [9] Fazekas, I. Gy.: Mästung durch Steigerung der Nebennierenrinden-Funktion. (Monogr.) Acta Medica Szeged. **12**, 2 (1949). — [10] Fazekas, I. Gy.: Endokrinologie **31**, 365 (1954). — Kisérletes Orvostudomány **7**, 196 (1955). — [11] Fazekas, I. Gy.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 279 (1955). — Kisérletes Orvostudomány **7**, 258 (1955). — [12] Fazekas, I. Gy.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 236 (1955). — Kisérletes Orvostudomány **7**, 536 (1955). — [13] Fazekas, I. Gy.: Endokrinologie **32**, 315 (1955). — Kisérletes Orvostudomány **7**, 267 (1955). — [14] Fazekas, I. Gy.: Kisérletes Orvostudomány **7**, 544 (1955). — Endokrinologie **33**, 151, (1956). — [15] Fazekas, I. Gy.: Endokrinologie **33**, 194 (1956). — [16] Fazekas, I. Gy.: Pflügers Arch. **262**, 431 (1956). — [17] Green, D. M.: Endokrinologie **43**, 325 (1948). — [18] Hechter, O., M. M. Solomon, J. A. Caspi, E. Macchi and M. Feinstein: J. Clin. Endokrin. **12**, 935 (1952). — [19] Ingle, D. J.: Amer. J. Physiol. **116**, 622 (1936). — Endokrinologie **34**, 191 (1944). — [20] Kendall, E. O., C. H. Slocumb and H. F. Polley: Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. **24**, 181 (1949). [21] Kovács, K., u. A. Jakobovits: Kisérletes Orvostudomány **6**, 214 (1954). — [22] Kramer, B., and F. F. Tisdal: J. of Biol. Chem. **48**, 4 (1921); **53**, 241 (1922). — [23] Kuhlmann, D., C. Ragan, J. W. Ferrebee, D. W. Atchley and R. F. Loeb: Science (Lancaster, Pa.) **90**, 498 (1939). — [24] Loeb, R. F., D. W. Atchley, J. W.

Ferrebee and C. Ragan: Trans. Assoc. Amer. Physicians **54**, 285 (1939). — [25] Paschkis, K. E., A. Kantarow and V. Boyle: Federat. Proc. **10**, 101 (1951). — [26] Ragan, C., J. W. Ferrebee, P. Phyfe, D. W. Atchley and R. F. Loeb: Amer. J. Physiol. **131**, 73 (1940). — [27] Read, G.: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **29**, 161 (1951). — [28] Rourke, G. M.: J. of Biol. Chem. **78**, 337 (1928). — [29] Swingle. W. W., and J. J. Pfiffner: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **28**, 510 (1931). — Amer. J. Physiol. **96**, 164 (1931). — Medicine (Baltimore) **11**, 371 (1932). — [30] Swingle, W. W., and J. W. Remington: Physiologic Rev. **24**, 89 (1944). — [31] Thorn, G. W., and H. Eisenberg: Endokrinologie **25**, 39 (1939). — [32] Thorn, G. W., R. T. Howard and K. Emerson jr.: J. Clin. Invest. **18**, 449 (1939). — [33] Thorn, G. W., and K. Emerson jr.: Ann. Int. Med. **14**, 757 (1940). — [34] Zimmermann, W.: Z. physiol. Chem. **233**, 257 (1935); **243**, 45 (1936). — [35] Zimmermann, W.: Vitamine u. Hormone **5**, 1, 124, 152, 170, 237, 260, 276 (1944).

Prof. Dr. I. Gy. Fazekas, Szeged/Ungarn, Inst. f. ger. Med. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 161—166 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Karl-Marx-Universität Leipzig
(Direktor: Prof. Dr. Hauschild)

Zur Wirkungsspezifität von Komplexsalzen des Äthylendiamin-tetraessigsauren Natrium

Von
Günter Dentzer

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. April 1956)

In einer früheren Arbeit konnten wir sowohl am Froschherzen als auch an der Magnesiumnarkose der Maus für Calcium-äthylen-diamin-tetraessigsaures Natrium (in der Folge als Calciumkomplex bezeichnet) keine wesentlichen Ionenwirkungen nachweisen. Bei unseren Weckversuchen verwandten wir Dosen von Calciumkomplex bis zu 1,48 g/kg Maus, d. h. die 8fache Menge von Calcium, die als Calciumchlorid deutlichen Weckeffekt zeigte. Nach unveröffentlichten Arbeiten anderer Autoren ist diese erhebliche Dosis von Calciumkomplex (LD 50 Maus 4—5 g/kg i. p.) zu gering und man soll erst bei noch höheren Dosen deutliche Weckeffekte bekommen.

Malorny u. Ohnesorge schließen aus Versuchen an dekapitierten künstlich beatmeten Katzen, daß die Weckwirkung des Calciumchlorid bei der Magnesiumnarkose als eine Verdrängungserscheinung des Magnesium durch Calcium an der Endplatte zu erklären ist.

Nach älteren Befunden von Locke am Nervenmuskelpräparat des Frosches wird durch Abwesenheit von Calcium die Impulsbahn an der myoneuralen Verbindungsstelle unterbrochen. Er nahm an, daß die normale Erregungsleitung einen „Kitt" zwischen Nerven und Muskelgewebe erfordert, welcher reversibel gelockert und gefestigt werden kann, jedoch stets einen gewissen mittleren Grad von Festigkeit besitzen muß, damit die Erregungswelle die Synapse passieren kann.

Nach diesen Befunden könnte man sich also die Weckwirkung des Calcium bei der Magnesiumnarkose als eine Wiederherstellung dieses „mittleren Grades von Festigkeit" durch Verdrängung des Magnesiums nach Calciumionenapplikation erklären.

Es liegt nun nahe, die kurzanhaltende Weckwirkung von hohen Dosen Calciumkomplex auf eine, wenn auch nicht sehr starke Abdissoziation von Calciumionen zurückzuführen. Die übereinstimmende starke

Hemmung der Urethan- und Traubenzuckerhämolyse durch Blei- und Calciumkomplex veranlaßte uns jedoch zu prüfen, inwieweit die Weckwirkung von Calciumkomplex auch anderen Komplexverbindungen des Äthylen-diamin-tetraessigsauren Natrium zukommt. Die Komplexkonstanten der verwendeten Komplexsalze mußten bei diesen Versuchen über der des Calcium liegen, da im anderen Falle Calciumentzugserscheinungen auftreten, die bei hohen Dosen zum Exitus, bei niederen Dosen aber nach Starkenstein zur Vertiefung der Magnesiumnarkose führen.

Wir wählten für unsere Versuche den Blei-, Mangan- und Thoriumkomplex. Wegen der auch unter physiologischen Verhältnissen hohen Affinität des Äthylen-diamin-tetraessigsauren Natrium zu Blei und Mangan wurde der Calciumkomplex zur Entgiftung von Blei- und Manganvergiftungen vorgeschlagen und verwendet. Über die Stabilität des Thoriumkomplexes berichteten Hauschild u. Dentzer in einer früheren Mitteilung. Der Blei- wie auch der Mangankomplex liegt im Gegensatz zum schwerer löslichen Thoriumkomplex in Form seines Dinatriumsalzes vor.

Experimenteller Teil

1. Untersuchungen an der Magnesiumnarkose der Maus

Wir gaben 1 g $MgSO_4 + 7\ H_2O$/kg Maus i. p. als 8,5%ige Lösung und erreichten damit eine typische Narkose. In den einzelnen Versuchsreihen wurden jeweils 12 Tiere verwendet. Die intravenösen Calciumchlorid- und Komplexsalzapplikationen erfolgten nach Eintritt der vollen Magnesiumlähmung.

Durch i. v. Injektion von 50 mg Calciumchlorid/kg als 1%ige Lösung war in jedem Falle eine Weckwirkung zu erzielen. Ein Rückfall in das Lähmungsstadium beobachteten wir nicht. Injektion von 2,97 g Calciumkomplex/kg, also der 16fachen Menge von Calcium, die als Calciumchlorid wirksam war, führte ebenfalls zu einem deutlichen Weckeffekt. Gegen Ende der Injektion erhoben sich die Tiere, fielen jedoch nach durchschnittlich 5,5 min in den Lähmungszustand zurück (Seitenlage).

Da wir den Calciumkomplex als 0,37 molare Lösung verwendeten und somit 20 ml/kg applizierten, mußte zunächst ein reiner Verdünnungseffekt ausgeschlossen werden. Wir gaben einer weiteren Versuchsreihe von 12 Mäusen nach Eintritt der Magnesiumlähmung 20 ml physiologische Kochsalzlösung/kg und konnten keine Beeinflussung des Lähmungszustandes beobachten. Um eine osmotische Wirkung der 0,37 molaren Calciumkomplexlösung auszuschließen, injizierten wir 12 weiteren Mäusen 20 ml einer 3,28%igen NaCl-Lösung. Auch jetzt war kein Einfluß auf die Magnesiumlähmung zu erkennen.

Zur Klärung der Calciumspezifität des Weckeffektes nach Calciumkomplex injizierten wir in drei weiteren Versuchsreihen je 12 Tieren äquimolare Mengen von Blei-, Mangan- und Thoriumkomplex. *Sowohl nach Blei- als auch nach Mangankomplexapplikation beobachteten wir die gleiche Weckwirkung wie nach Calciumkomplex.*

Gegen Ende der Injektion erwachten die Tiere. Die mit Bleikomplex vorbehandelten fielen nach durchschnittlich 5,3 min, die mit Mangankomplex vorbehandelten nach durchschnittlich 5,7 min in den Lähmungszustand zurück. Um eventuelle Ionenwirkungen auszuschließen, injizierten wir Blei- und Mangansalze in verschiedenen Dosierungen. Wir konnten keine Weckwirkung beobachten. Thoriumkomplexgabe zeigte in keinem Fall einen Weckeffekt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

	Unbehandelt	Nach Eintritt der Magnesiumlähmung			
		2,97 g/kg Ca—K	4,25 g/kg Pb—K	3,1 g/kg Mn—K	50 mg/kg $CaCl_2$
Tierzahl	12	12	12	12	12
Länge d. Weckeffektes im Mittel	—	5,5 min	5,3 min	5,7 min	kein Rückfall in Narkose
Durchschnittliche Abweichung	—	± 1,6	± 2,2	± 1,8	—
Dauer der Narkose im Mittel	53 min	62 min	71 min	78 min	—
Durchschnittliche Abweichung	± 21	± 25	± 19	± 27	—
Exitus	1	2	2	1	0

2. Versuche am Phrenicus Zwerchfellpräparat der Ratte

Magnesiumionen zeigen an der motorischen Endplatte eine curareartige Wirkung. Die indirekte Reizbarkeit läßt sich mit einer bestimmten Magnesiumionen-Konzentration vollkommen aufheben. Calciumionenzugabe führt zur Abschwächung bzw. Aufhebung des Magnesiumeffektes. Es sollte geprüft werden, inwieweit die Calcium-, Blei- und Mangankomplexsalze parallel den Weckversuchen an der Maus in der Lage sind, die Magnesiumwirkung auch am isolierten Nervmuskelpräparat aufzuheben.

Verwendet wurde das Phrenicus-Zwerchfellpräparat nach der von Bülbring angegebenen Methode. Die elektrische Reizung erfolgte mittels rhythmischer Kondensator-Entladungen (8–10 Reize min). Es wurde die von A. Aebi u. L. Aebi angegebene Elektrode verwendet und indirekt gereizt. Das Versuchsgefäß enthielt 50 ml Tyrodelösung, die auf einer Temperatur von 35 C gehalten wurde. Die Tyrodelösung war folgendermaßen zusammengesetzt: NaCl 0,8%; KCl 0,02%; $CaCl_2$ 0,02%; $MgCl_2 + H_2O$ 0,001%; $NaHCO_3$ 0,1%; NaH_2PO_4 0,005%; Glucose 0,2%.

Die Ausgangskonzentration der Magnesiumionen in der Tyrodelösung betrug 0,13 mg-%. Wurde sie durch Zugabe von 1,75 ml $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 10%ig auf 35 mg-% erhöht, so wurde bei gleicher Reizstromstärke die indirekte Reizbarkeit vollkommen aufgehoben. Durch Zugabe von 27 mg Calcium als $CaCl_2$ (Endkonzentration von Ca^{++} 61 mg-%) konnte die ursprüngliche Erregbarkeit wieder hergestellt werden (Abb. 1). Mit der 4fachen Menge von Calcium (105 mg) in Form von Calciumkomplex

(980 mg) wurde die neuromuskuläre Blockade ebenfalls durchbrochen; die Amplitude der Zwerchfellkontraktion blieb jedoch klein (Abb. 1). Eine Erhöhung der Amplitude war auch durch Steigerung der Dosis nicht zu erzielen. *Sowohl mit Blei- wie auch mit Mangankomplex* in äquimolaren Dosen konnten wir gleiche Effekte erzielen (Abb. 1 u. 2). Mit Thoriumkomplex hingegen war die neuromuskuläre Blockade nie zu durchbrechen. Versuche, mit Blei- oder Mangansalzen in verschiedenen Dosierungen ähnliche Effekte zu erzielen, schlugen fehl.

Eine antagonistische Beeinflussung der Magnesiumlähmung durch Blei- oder Mangansalze ist im Schrifttum nicht bekannt. Starkenstein

Abb. 1. Versuche am Phrenicus-Zwerchfellpräparat: *1:* 175 mg $MgSO_4 + 7\ H_2O$, *2:* 1,41 g Pb-Komplex, *3:* 175 mg $MgSO_4 + 7\ H_2O$, *4:* 0,98 g Ca-Komplex, *5:* 175 mg $MgSO_4 + 7\ H_2O$, *6:* 75 mg Calciumchlorid

hat darauf hingewiesen, daß Manganverbindungen nach parenteraler Zufuhr zu Lähmungen des Zentralnervensystems führen, die dem Bild der Magnesiumnarkose ähneln. Nach unveröffentlichten Untersuchungen von S. Hermann kann die durch Mangansalze hervorgerufene Narkose mittels Calcium unterbrochen bzw. aufgehoben werden. Mangan zeigt also auf das Nervensystem eine dem Magnesium ähnliche Wirkung.

Zweifellos bestehen Analogien zwischen Blei und Calcium in chemischer Hinsicht; auch in biologischer Beziehung zeigt sich zwischen beiden eine gewisse Parallelität. Diese ergibt sich besonders aus der Affinität zum Skeletsystem und der Ausscheidung. So wirken alle entkalkenden Agentien, u. a. Säure und Collips-Hormon, auch entbleiend. Am Nervmuskelpräparat wie auch am Ganztier stehen Lähmungserscheinungen im Vordergrund, wobei die Meinungen über eine nervale oder muskuläre Schädigung auseinander gehen.

Da auch wir in verschiedener Dosierung keine antagonistische Beeinflussung der Magnesiumlähmung durch Blei- oder Mangansalze beobachten konnten, die molare Abhängigkeit bei den verschiedenen Komplexsalzen aber offensichtlich ist, muß der kurzanhaltende Weckeffekt nach Calciumkomplexapplikation als *calciumunspezifisch* und der Gesamtstruktur des Komplexes eigen angesehen werden.

Nach unseren oben besprochenen theoretischen Vorstellungen von der Magnesiumlähmung müssen wir annehmen, daß der kurzanhaltende Weckeffekt wie auch das magnesiumantagonistische Verhalten am isolierten Nervmuskelpräparat durch eine membranstabilisierende Wirkung der Komplexsalze zu erklären ist. Wenn auch nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse am Muskel übertragbar, wird diese Ansicht bestärkt durch den bereits an Hämolyseversuchen nachgewiesenen membranstabilisierenden Effekt. Durch hohe Dosen von stabilen Komplexsalzen scheint jener „mittlere Grad von Festigkeit" an der myoneuralen Transmission erreicht zu werden, der nötig ist, damit die Erregungswelle die Synapse passieren kann. Das verschiedene Verhalten von Calcium-, Blei- und Mangankomplex gegenüber dem Thoriumkomplex zwingt zu der Annahme, daß diese Membranwirkung interessanterweise an den anionischen Komplex gebunden sein müßte. Thorium mit vier Hauptvalenzen nimmt dem Komplex seinen Anionencharakter.

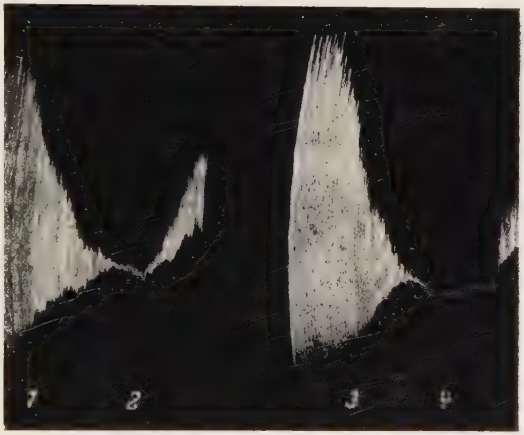


Abb. 2. *1*: 175 mg $MgSO_4$ + 7 H_2O, *2*: 1,010 g Mn-Komplex, *3*: 175 mg $MgSO_4$ + 7 H_2O, *4*: 0,98 g Ca-Komplex

Zusammenfassung

1. In subtoxischen Dosen wird die Magnesiumnarkose der Maus durch den Calciumkomplex für kurze Zeit durchbrochen.

2. Blei- und Mangankomplexe zeigen in äquimolaren Dosen gleiche Wirksamkeit, nicht dagegen Thoriumkomplex.

3. Am Phrenicus-Zwerchfellpräparat läßt sich durch hohe Dosen von Calciumkomplex die durch Magnesium erzeugte neuromuskuläre Blokkade durchbrechen. Die Amplitude steigt auf 10—20% des Ausgangswertes an. Derselbe Effekt ist durch Blei- und Mangankomplexzugabe zu erreichen, nicht jedoch durch Thoriumkomplex.

4. Hohe Dosen von stabilen Komplexsalzen des Äthylen-diamin-tetraessigsauren Natrium zeigen calciumartige Effekte, die bei der Prüfung des Calciumäthylen-diamin-tetraessigsauren Natrium auf Ionenwirkung zu Fehlschlüssen Anlaß geben können.

5. Das verschiedene Verhalten von Calcium-, Blei- und Mangankomplex gegenüber dem Thoriumkomplex zwingt zu der Annahme, daß die oben beschriebenen unspezifischen Effekte an den anionischen Komplex gebunden sind, da Thorium mit vier Hauptvalenzen dem Komplex seinen Anionencharakter nimmt.

Die Komplexverbindungen wurden von Herrn Dipl. Chem. Reinhard Schmiedel an unserem Institut hergestellt.

Literatur

Aub, J. C., A. S. Minot, L. T. Fairhall and P. Reznikoff: J. Amer. Med. Assoc. **83**, 588 (1924); zit. nach F. Flury, Heffters Handbuch d. exper. Pharmakol., S. 1744, III, 3 (1934). — Bauer, R. O., F. R. Rullo, S. Spooner and E. Woodmann: Federat. Proc. **1**, 321 (1952). — Dentzer, G.: Pharmazie **12**, 734 (1955). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 140—151 (1955). — Dozzi, L.: Sperimental **66**, 666 (1913); zit. nach F. Flury, Heffters Handbuch d. exper. Pharmakol., S. 1805, III (1934). — Harnack, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **9**, 152 (1878). — Hauschild, F., u. G. Dentzer: Klin. Wschr. **1955**, 495/96. — Naturwissenschaften **19**, 538 (1955). — Hunter, D., and J. Aub: Lead Studies XV Med. clin. Massachus Hosp. Quart. J. Med. 20. — Locke, F. G.: Zbl. Physiol. **8**, 166 (1894). — Malorny, G., u. F. K. Ohnesorge: Naturwissenschaften **38**, 481/82 (1951). — Rodier, J., R. Mallet et L. Rodi: Arch. Mal. profess. **15**, 210—23 (1954). — Rubin, M., et. al.: Science (Lancaster, Pa.) **112**, 367 (1950). — Zidbury, J. B., et. al.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **82**, 226 (1953). — Starkenstein, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **77**, 45 (1914). — Verh. dtsch. pharmakol. Ges. **67** (1932), zit. nach Langecker, Heffters Handbuch d. exper. Pharmakol., S. 1340, III, **2** (1934).

Dr. G. Dentzer, Pharmakol. Institut der Karl-Marx-Universität, Leipzig-C 1, Härtelstr. 16/18

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 167—170 (1956)

Aus der Universitäts-Kinderklinik Heidelberg
(Direktor: Professor Dr. Ph. Bamberger)

Einfluß von Cytostatica auf Einbau von Lysin in Gewebsproteine

Von

Kurt Schreier, Eberhard Zöller und Boris Vira-Wissarianow

(Eingegangen am 16. April 1956)

Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß Anaerobiose, Arsenate, Arsenite, Fluoride, Azide und Dinitrophenol den Einbau von markierten Aminosäuren (AS) in Zellstrukturen und Gewebshomogenate hemmen (z. B. Borsook u. Mitarb.). Auch die Freisetzung markierter AS aus den Eiweißkörpern von Leberschnitten wird durch Sauerstoffmangel, Dinitrophenol und Cyanide vermindert (Simpson).

Uns interessierte die Frage, ob ein Einfluß der in der Humanmedizin jetzt vielfach verwendeten Cytostatica auf den AS-Stoffwechsel des Gewebes mit Hilfe von gekennzeichneten AS demonstrierbar ist. Wir hofften so zum Verständnis des Wirkungsmechanismus dieser Cytostatica einen Beitrag liefern zu können.

Methodik

Die Versuchsanordnung gestaltete sich genau so wie in einer kürzlichen Mitteilung beschrieben wurde (Schreier, Zöller, Vira-Wissarianow, Nöller u. Madsen). Für die Hemmversuche wurde hauptsächlich menschliches Knochenmark

Die *Ergebnisse* sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

	Substanz 0,1 cm³/Versuch	Konzentration in (mg/ml)	Hemmung (in %)	Zahl der Versuche
1	Aminopterin	0,01	5	6
2	Sinalost	1,0	29	4
3	N-Oxyd-Lost	25,0	63	3
4	Colchicin	1,0	1	1
5	Demecolcin Präp. 12669	1,0	2	1
6	Triamelin	1,0	18	3
7	Cytostaticum G 4073	0,5	29	2
8	Khellin	10,0	35	2
9	Aureomycin	1,0	24	3
10	Terramycin	1,0	30	5
11	Sanamycin	0,1	26	5
12	Erythromycin	1,0	23	7

herangezogen, da ja die therapeutischen Effekte und auch die unerwünschten Nebenwirkungen der das Zellwachstum hemmenden Substanzen sich hauptsächlich an diesem Organ abspielen. Einige Studien wurden auch mit Placenta und Leber von Ratten vorgenommen.

Diskussion

Über den Einfluß von Cytostaticis und ähnlichen Substanzen auf den Stoffwechsel markierter AS in vivo und in vitro liegen, soweit wir die Literatur übersehen, kaum Untersuchungen vor. Skipper u. Mitarb. haben mit C^{14}-Natrium-Formiat bei Mäusen einige Studien vorgenommen. Sie fanden in vivo eine zum Teil signifikante Erhöhung des von Einbaus Formiat in die Purine der Nucleinsäuren durch Stickstoff-Lost, Urethan, Colchicin usw. Hevesy konnte eine Vermehrung des C^{14}-Acetat-Einbaus nach Urethan sowie Röntgenstrahlen nachweisen. Grossman zeigte, daß Penicillin und offenbar auch Aureomycin in vitro den Einbau von C^{14}-Glykokoll hemmen. Gale u. Paine schließlich demonstrierten, daß Aureomycin und Chloromycetin die Eiweißsynthese bei Bakterien herabsetzen. Dies wurde neuerdings von Gale auch für zertrümmerte Staphylokokkenzellen bestätigt. Vor kurzem haben auch Werkheiser u. Mitarb. über die Hemmung der P^{32}-, C^{14}-Formiat und C^{14}-Asparaginat-Einbau in die Nucleotide durch 2,6-Diaminopurin und 5-Aminouridin berichtet. Diese Befunde sind für die Interpretation unserer Ergebnisse mit Homogenaten von Warmblüterorganen von besonderer Bedeutung.

In unseren Versuchen hat sich ergeben, daß Aminopterin in vitro keinen Einfluß auf den ε-C^{14}-Lysin-Einbau ausübt. Das war eigentlich zu erwarten, da ja bekanntlich dieser Folsäureantagonist irgendwie die Transferierung der freien Methylgruppen in die Purine hemmt. Bei einem Versuch in vivo dagegen fand sich vor allem in der embryonalen Rattenleber eine Hemmung des Glykokoll-Einbaus um etwa 40% (Schreier u. Mitarb.). Offenbar setzt Aminopterin die Syntheserate der Ribonucleinsäuren herab.

Lost in Form von Sinalost und N-Oxyd-Lost zeigt durchweg eine zum Teil massive Hemmung der Einbaurate. Dazu ist allerdings zu bemerken, daß sich das p_H des Ansatzes durch die Zugabe des N-Oxyd-Lost deutlich nach der sauren Seite verschob. In einem Kontrollversuch haben wir festgestellt, daß ein p_H-Abfall bis auf 5,7 sich nicht negativ auf den Lysineinbau auswirkt. Eine stichhaltige Erklärung für den Mechanismus des Eingreifens von Stickstoff-Lost in den AS-Einbau können wir nicht geben. Pardee sowie Sher und Mallette haben bei E. coli durch Lost zwar Wachstumsstillstand erreicht, aber die Synthese von Adaptivenzymen nicht völlig hemmen können. Das würde bedeuten, daß die Desoxyribonucleinsäure-Synthese blockiert wird, nicht aber der Eiweißaufbau. Vielleicht liegen die Verhältnisse im Makroorganismus anders, so daß es zu Abbaureaktionen an den Nucleinsäuren kommt, wie es von Butler u. Mitarb. beschrieben wurde.

Colchicin und Demecolcin (Präp. 12669) hatten keinen hemmenden Einfluß. Dieses Ergebnis rechtfertigt die Annahme, daß die von uns studierte Eiweißsynthese im Homogenat wirklich eine echte Synthese

ist und daß die markierte AS nicht nur an der Zelloberfläche adsorbiert wird.

Die geringgradige Hemmung durch Triamelin (= Triäthylenmelamin) beruht wahrscheinlich auf einer unspezifischen Nebenwirkung; denn es handelt sich ja im wesentlichen um einen Mitosehemmer. Allerdings wird z. T. auch die Ansicht vertreten, Triamelin entfalte seine Wirkungen vor der Mitose (Linke).

Die beiden Chinonderivate Cytostaticum G 4073 und Khellin — das man zu den Chinonderivaten zählen kann (Apffel) — zeigen durchweg eine deutliche Hemmung des Lysineinbaus. Diese ist in Übereinstimmung mit der starken Wachstumshemmung von zahlreichen Tumoren (Loustalot u. Mitarb. und jener von Fibroblastenkulturen (Friedmann u. Mitarb.). Auch hier fällt ein Erklärungsversuch recht schwer. Histologisch zeigen sich nach Chinonapplikationen Chromosomenschäden. Man wird annehmen dürfen, daß ein Einfluß auf den Nucleinsäurenumsatz vorhanden ist.

Die Tetracycline können gemeinsam abgehandelt werden. Der durchschnittliche Hemmeffekt des Lysineinbaus liegt bei etwa 27%. Für die Erklärung dieses Effektes scheint es erforderlich, auf einige Grundkonzeptionen der Proteinsynthese einzugehen.

Wir stellen uns heute vor, daß der Neubildung eines Eiweißmoleküls der Aufbau einer „Matritze" (Template) in Form eines Ribonucleinsäurenmoleküls vorausgehen muß. Ein Aufbau eines Protein-Moleküls ist natürlich nicht möglich ohne die gleichzeitige Anwesenheit aller dafür erforderlichen AS. In einem Gewebshomogenat ist diese Notwendigkeit stets erfüllt. Für die Knüpfung der Peptidbindungen müssen die AS „aktiviert (energiereich gemacht) werden. Dies geschieht sehr wahrscheinlich durch Adenosintriphosphorsäure, wobei als Intermediärprodukt möglicherweise Säureamide entstehen. Durch Lieferung der erforderlichen Energie greifen demnach die Prozesse des aeroben und anaeroben Kohlenhydrat-Stoffwechsels intensiv in die Eiweißsynthese ein.

Da die Tetracycline offenbar die Phosphorylierung entkoppeln (Loomis; Levine u. Tarver), ist es verständlich, daß entsprechende Dosen dieser Antibiotica über die Blockierung des Energiestoffwechsels den Eiweißaufbau hemmen. Nun ist aber nach Borsook die Dosis, welche den Eiweiß-Stoffwechsel beeinflußt, wesentlich niedriger als die erforderliche Menge für die Entkoppelung des Energiestoffwechsels. Man muß demnach eine direkte Einflußnahme auf die Matritze postulieren. Park hat bei Mikroorganismen, deren Wachstum durch Antibiotica gehemmt war, inkomplette Proteine isolieren können, welche er auf eine Beladung der Matrize durch das Antibioticum entstanden glaubt. Sehr wahrscheinlich beruht die Wirkung von Sanamycin (Hackmann) und vielleicht auch Erythromycin auf ähnlichen Mechanismen; denn auch Chloromycetin und Penicillin scheinen zumindest im Bakterienstoffwechsel direkt an der Matrize anzugreifen.

Natürlich wird der Einwand laut werden, ob mit der Methode der in vitro-Inkorporation von AS überhaupt Proteinsynthese nachgewiesen werden kann. Abgesehen davon, daß durch mehrfache Waschung mit Trichloressigsäure, Hydrolyse und Isolierung von markierten Peptiden der Einwand als endgültig widerlegt gelten kann, bilden die hier mitgeteilten Versuche einen weiteren Beweis dafür, daß wir mit dieser Methodik wirklich Eiweißaufbau erfassen. Die Zugabe von so verschwindend geringen Mengen chemisch inerter Substanzen wie z. B. 0,01 mg Sanamycin hat einen drastischen Einfluß auf die Inkorporation, während andere Substanzen in 10—100fach höherer Konzentration jeden Einfluß vermissen lassen. Für die experimentelle Krebsforschung ist hiermit ein Weg aufgezeigt, cytostatisch wirksame Substanzen zu testen und einen ersten Einblick in das voraussichtliche Eingreifen einer Substanz in den Zellstoffwechsel zu erhalten.

Zusammenfassung

Es wird berichtet über den Einfluß von 12 Cytostatica auf die Inkorporation von ε-C^{14}-Lysin* in die Homogenate von menschlichem Knochenmark, Rattenleber und Rattenplacenta. Deutlich war die Hemmung von N-Oxyd-Lost, Sinalost, Khellin, Cytostaticum G 4073, Terramycin, Aureomycin und Sanamycin.

* Wir sind der Max Kade Foundation für das markierte Lysin zu großem Dank verbunden. Die Messung der spezifischen Aktivität wurde mit einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellten Geigerzähler vorgenommen.

Literatur

Apffel, C. A.: Dtsch. med. Wschr. **1955**, 12. — Borsook, H.: III. Int. Congress Biochemie, Brüssel 1955. — Borsook, H., C. L. Deasy, A. J. Haagen-Smit, G. Keighley and P. H. Lowy: J. of Biol. Chem. **186**, 297 (1950). — Butler, J. A. V., L. Gilbert, D. W. F. James and W. C. J. Ross: Nature (Lond.) **168**, 985 (1951). — Friedmann, E., D. H. Marrian and I. Simon-Reuss: Brit. J. Pharmacol. **3**, 263 (1948). — Gale, E. F.: 148th Meeting of the Biochem. Soc. (London). Februar 1956. — Gale, E. F., and T. F. Paine: Biochemic. J. **48**, 298 (1951). — Grossman, C. M., J. D. Hauschildt and J. D. Case: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **82**, 285 (1953). - Hackmann, C.: Med. Klinik **49**, 1539 ((1954). — Z. Krebsforsch. **60**, 250 (1954). — Hevesy, G.: Nature **164**, 269 (1949). — Levine, M., and H. Traver: J. of Biol. Chem. **184**, 427 (1950); **192**, 835 (1951). — Linke, A.: Persönliche Mitteilungen. — Loomis, W. F.: Science (Lancaster, Pa.) **111**, 474 (1950). — Loustalot, P., B. Schär u. R. Meier: Experientia (Basel) **11**, 186 (1955). — Pardee, A. B.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **40**, 263 (1954). — Park, J. T.: J. of Biol. Chem. **194**, 877 (1952). — Schreier, K., E. Zöller, V. Vira-Wissarianow, O. P. Madsen, H. G. Nöller: Z. Kinderh. im Druck (1956). — Schreier, K., u. Mitarb.: in Vorbereitung. — Sher, I. H., and M. F. Mallette: Arch. of Biochem. a. Biophysics **52**, 331 (1954). — Simpson, M. V.: J. of Biol. Chem. **201**, 143 (1953). Skipper, H. E., J. H. Mitchell, L. L. Bennett et al: Cancer Res. **2**, 145 (1951). — Werkheiser, W. C., and D. W. Visser: Cancer Res. **15**, 644 (1955).

Dozent Dr. K. Schreier, Heidelberg, Univ.-Kinderklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 171—181 (1956)

Aus der Medizinischen Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. R. Duesberg)

Die Wirkung von Purinen, Prohepar, Hepanovin und Nucleotrat auf Knochenmarkskulturen*

Von
L. Friederici

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Februar 1956)

In einer früheren Mitteilung, die über den Einfluß verschiedener Wuchsstoffe auf das Knochenmarkswachstum in vitro berichtete, konnte gezeigt werden, daß die Pflanzenwuchsstoffe 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Aminocapronsäure in schwächeren Konzentrationen eine statistisch gesicherte Proliferationsförderung und eine deutliche Verlängerung der Lebensdauer der Kulturen auslösten. Eine ähnliche Vitalitätssteigerung ließ sich mit dem Wirkstoffkomplex T-Vitamin Goetsch und dem Wundgranulationsextrakt WGH-Solco erzielen, wobei besonders eine Proliferation von mehr oder weniger differenzierten Rundzellen in den Kulturen auffiel. In weiteren Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, welchen Einfluß einige verschieden substituierte Purinkörper auf das Zellwachstum in vitro ausüben.

Wir gingen dabei methodisch in der gleichen Weise wie bereits früher mitgeteilt vor und setzten die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen den Versuchskulturen zu. Die Kontrollkulturen enthielten statt der Purinkörper die gleiche Menge einer physiologischen Salzlösung nach Pannet-Compton (PC). Das Kulturmedium bestand zu gleichen Teilen aus Huhnplasma, Hühnerembryonalextrakt, Humanserum und der Salzlösung PC bzw. der mit PC verdünnten Purinkörper. Das Umsetzen der Deckglaskulturen erfolgte am 5. Tag. Die Wachstumsgröße der einzelnen Kulturen wurde durch Planimetrieren der am 4. Tag bei Lupenvergrößerung mit dem Zeichenspiegel projizierten Mutterstücke und Wachstumszonen bestimmt und die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen nach der Varianzanalyse von Snedecor statistisch gesichert. Ausstrichpräparate der Kulturen wurden nach 20 Std, Totalpräparate nach 2—5 Tagen, zum Teil nach 2—3 Wochen angefertigt und nach Pappenheim gefärbt.

Ergebnisse

Das Präparat X 25, ein 1,7-Dimethylhypoxanthin[1], wurde an 170 Kulturen getestet. Dabei zeigte sich, daß in einem Konzentrationsbereich von 1 : 4 bis 1 : 400 das Wachstum völlig gehemmt war. Es kam

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

[1] Für die Überlassung der Purinkörper danken wir der Firma C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim.

lediglich während des ersten Tages zur passiven Ausschwemmung von Rundzellen aus dem Mutterstück. Bei einer Konzentration von 1 : 4000 war dagegen in geringem Ausmaß ein aktives Zellwachstum erkennbar. Neben Myelocyten und reiferen Granulocyten enthielt die Wachstumszone spindelige Zellen, die auch nach dem Umsetzen in frisches Medium spärlich weiter wuchsen. Ein normales Wachstum war erst bei einer Verdünnung von 1 : 40000 vorhanden (Abb. 1). Es übertraf meist das der Kontrollen und zeigte auch nach dem Umsetzen eine gute Proliferation

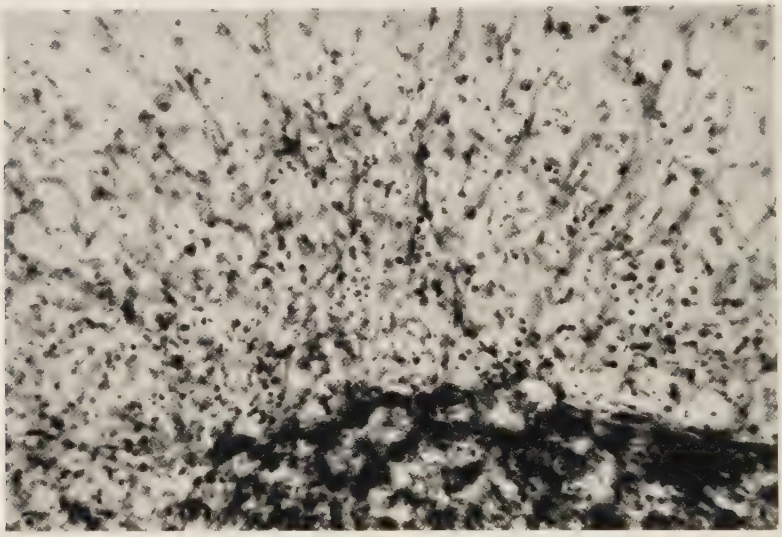


Abb. 1. 4 Tage alte Knochenmarkskultur mit 1,7-Dimethylhypoxanthin 1 : 4000

der Spindel- und Rundzellen, so daß diese Knochenmarkskulturen bis zu 47 Tagen lebend erhalten werden konnten. Mit weiterer Verdünnung nahm der Effekt des 1,7-Dimethylhypoxanthins wieder ab (Tab. 1).

Die Wirkung des Präparates RA 5, eines 2,7,9-Trimethyl-8,10-Dioxyhomopurins, wurde an 273 Rattenknochenmarkskulturen geprüft. In allen angewandten Konzentrationen war das Wachstum deutlich gehemmt und sistierte nach dem ersten Umsetzen gänzlich. Die Wachstumszonen, die meist von plumperen reticulären Zellelementen gebilet wurden, waren schmaler als bei den Kontrollen und zeigten zentral am Rande des Mutterstückes eine erhebliche Vermehrung der Mastzellen und Makrophagen. Stellenweise war auch eine Vermehrung der Plasmazellen zu beobachten. Die in die Peripherie ausgewanderten Rundzellen wiesen im gefärbten Totalpräparat weitgehende Degenerationserscheinungen auf; ihre Kerne waren pyknotisch oder hatten sich in mehrere Fragmente aufgelöst. In Ausstrichpräparaten ließ sich die Zellschädigung besonders

gut erkennen. Da die mechanische Einwirkung beim Ausstreichen der Präparate die Zellmembran der Granulocyten, die in vitro am schnellsten untergehen, trotz größter Vorsicht zum Zerreißen brachte, enthielten diese Präparate fast nur Kerntrümmer.

In einer Versuchsreihe von 322 Kulturen wurde der Einfluß von RA 27 auf das Knochenmarkswachstum in vitro untersucht. Dieses Präparat, ein 2-Methyl-9-Äthyl-10-Oxyhomopurin, hemmte in allen angewandten Konzentrationen, wie aus Tab. 1 zu ersehen ist, das Wachstum

Tabelle 1

		1 : 400	1 : 4000	1 : 40000	1 : 400000	1 : 4000000	Kontrolle
X 25 1,7-Dimethyl-hypoxanthin	$\frac{W}{M}$	2,4 $P < 0{,}01$	2,95 $P < 0{,}01$	4,35 $P < 0{,}01$	3,1 $P < 0{,}01$		4,02
RA 5 2,7,9-Trimethyl-8,10-Dioxyhomopurin	$\frac{W}{M}$	1,36 $P < 0{,}01$	3,39 $P < 0{,}05$	3,50 $P < 0{,}01$	3,89 $P < 0{,}01$	3,87 $P < 0{,}05$	4,72
RA 27 2-Methyl-9-Äthyl-10-Oxyhomopurin	$\frac{W}{M}$	1,42 $P < 0{,}01$	4,77 $P > 0{,}05$	4,77 $P > 0{,}05$	3,72 $P < 0{,}01$	3,70 $P < 0{,}05$	5,20
RA 18 2-Methyl-9-Allyl-10-Oxyhomopurin	$\frac{W}{M}$	1,32 $P < 0{,}01$	5,24 $P < 0{,}01$	4,59 $P > 0{,}05$	4,03 $P < 0{,}01$	4,43 $P < 0{,}01$	6,50

W Wachstumszone
M Mutterstück

der Explantate. Nur selten ließen sich aussprossende plumpere Spindelzellen auffinden. Meist bestanden die Wachstumszonen aus großen und kleinen Rundzellen, Makrophagen und Granulocyten verschiedener Reifegrade, die in der Peripherie deutliche Degenerationszeichen aufwiesen, während die zahlreichen eosinophilen Stab- und Segmentkernigen zum gleichen Zeitpunkt noch gut erhalten waren. Die Makrophagen enthielten Reste von Segmentkernigen und Erythrocyten. In den Versuchskulturen fiel eine Vermehrung der Rundzellenmitosen auf, die sich vorwiegend im Stadium der Metaphase befanden.

Das Präparat RA 18, ein 2-Methyl-9-Allyl-10-Oxyhomopurin, wurde in einer Versuchsserie von 224 Knochenmarkskulturen geprüft. Konzentrationen von 1 : 4 bis 1 : 400 ergaben dabei einen völligen Wachstumsstillstand, während Konzentrationen von 1 : 4000 bis 1 : 4000000 zu einer Vermehrung der Rundzellen führten (Abb. 2). Spindelzellverbände

traten nur bei minimalsten Gaben des Präparates auf (1 : 400000 und 1 : 4000000) und zeigten in diesen Versuchssätzen noch nach 18 Tagen

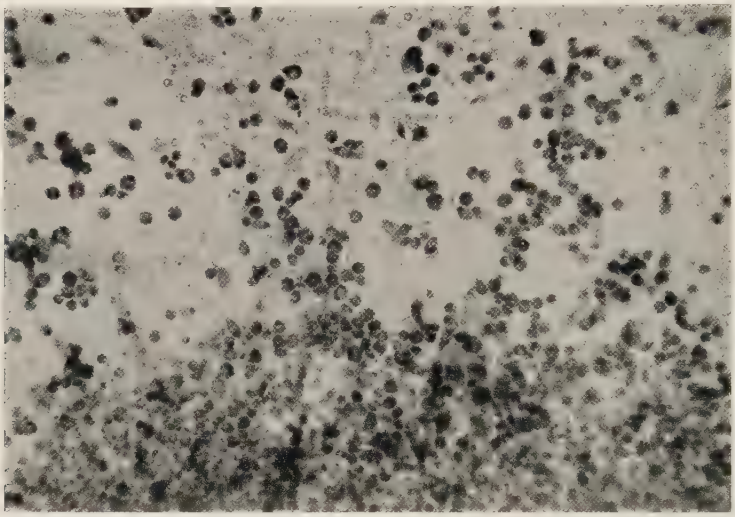


Abb. 2. 4 Tage alte Kultur mit 2-Methyl-9-Allyl-10-Oxyhomopurin 1 : 40 000

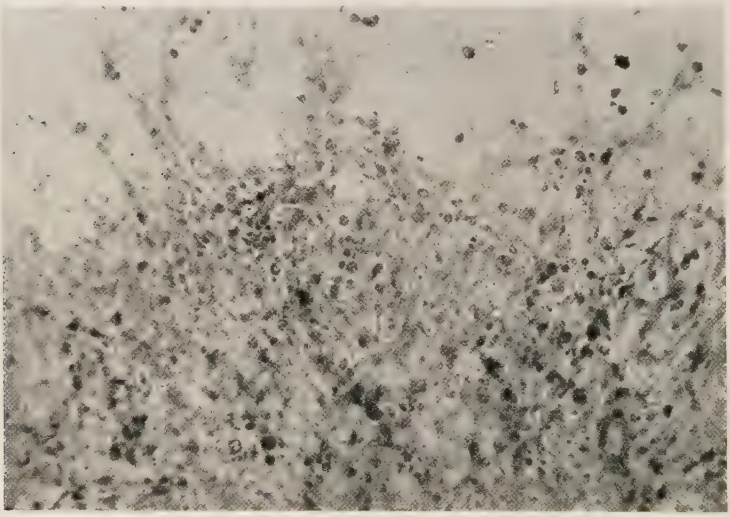


Abb. 3. 18 Tage alte Kultur mit 2-Methyl-9-Allyl-10-Oxyhomopurin 1 : 400000

zusammen mit Makrophagen und kleinen Rundzellen eine befriedigende Proliferationstendenz (Abb. 3). In den übrigen Versuchssätzen mit höheren Konzentrationen bestanden die Wachstumszonen während der ersten Woche aus gut erhaltenen Makrophagen, Myelocyten und

Eosinophilen mit degenerierten Segmentkernigen in der Peripherie. Die Wachstumszonen waren stets kleiner als bei den Kontrollkulturen (Tab. 1).

Wesentlich stärker als von den getesteten Purinen wurde das Knochenmarkswachstum von *Prohepar*[1], einem Leberhydrolysat, in der Gewebekultur beeinflußt (469 Kulturen), das uns ohne konservierende Zusätze von den Nordmarkwerken zur Verfügung gestellt wurde. Konzentrationen von 1 : 40 bis 1 : 4000000 besaßen eine deutliche Proliferationswirkung, die zu einer meist signifikanten Verbreiterung der

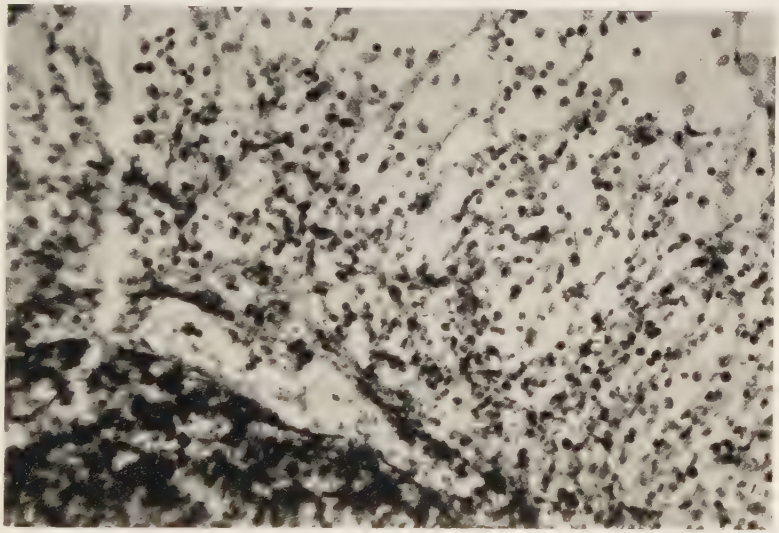


Abb. 4. 4 Tage alte Kultur mit Prohepar 1 : 40

Wachstumszonen führte (Tab. 2). Die beiden Versuchssätze mit 1 : 400 und 1 : 4000000 zeigten zwar im Mittel einen größeren Quotienten Wachstumszone : Mutterstück (W : M) als die Kontrollkulturen, wiesen aber so starke biologische Wachstumsschwankungen auf, daß die Ergebnisse statistisch nicht gesichert werden konnten. Wurde Prohepar unverdünnt den Kulturen zugegeben, kam es nach dem Umsetzen lediglich zu einer Ausschwemmung von Rundzellen ohne sicheres Wachstum. In allen anderen Versuchssätzen übertraf dagegen das Zellwachstum mit Prohepar auch nach mehrmaligem Umsetzen bei weitem das der Kontrollen und war nach 52 Tagen bei Abbruch der Versuche noch unvermindert vorhanden. Die Zellzusammensetzung der Wachstumszonen ließ eine gewisse Abhängigkeit von der Konzentration erkennen. Die

[1] Wir danken den Nordmarkwerken für die Überlassung ihrer Präparate Prohepar, Hepanovin und Nucleotrat.

Tabelle 2

		1:4	1:40	1:400	1:4000	1:40000	1:400000	1:4000000	Kontrolle
Prohepar	W	2,27	5,5	5,4	5,3	5,1	5,13	5,2	4,64
	M	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P > 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,01$	$P > 0,05$	$P < 0,05$	
Hepanovin	W		3,83	6,27	6,25	5,31	7,1	4,68	5,7
	M		$P < 0,01$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	
Nucleotrat	W	3,45	5,38	5,05	5,72	5,27	4,94	4,78	4,96
	M	$P < 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$	

Kulturen mit Prohepar 1 : 4 und 1 : 400 (Abb. 4) besaßen einen breiten und dichten Saum großer und kleiner Rundzellen um das Mutterstück, die zum Teil noch zu differenzieren waren, zum Teil aber auch als mononucleäre Stammzellen angesprochen werden mußten. Mit zunehmender Verdünnung des Leberhydrolysates traten neben den Makrophagen polymorphe reticuläre Zellen auf, die um das Mutterstück ein lockeres Netz bildeten und plumper als die schlanken spindeligen Zellelemente der Kontrollkulturen gestaltet waren. Meist waren auch reichlich Mastzellen zu finden.

Hepanovin, ein Kombinationspräparat aus Vitamin B 12, Folsäure, Leberwirkstoffen, Intrinsic-Faktor, kolloidgebundener Salzsäure, Eisen und Kobalt, das ebenfalls von den Nordmarkwerken ohne konservierende Zusätze geliefert wurde, rief an Rattenknochenmarkskulturen (350 Kulturen) eine unvergleichlich stärkere Proliferation der Rundzellen (Abb. 5, 6) hervor. In breiter Ausdehnung lagen neutrophile Granulocyten, Eosinophile und Mastzellen (Abb. 7) um das Mutterstück und waren selbst nach 14 Tagen noch nachweisbar, während die Kontrollkulturen bereits nach 8 Tagen vorwiegend Spindelzellen enthielten. Jugendliche Erythroblasten waren kaum vorhanden, dagegen fanden sich in der Peripherie Normoblasten und Erythrocyten. Mit schwächeren Hepanovinzusätzen traten neben schmalen Spindelzellen reichlich Makrophagen und Mastzellen auf. Die Wirkung der unverdünnten Hepanovinlösung konnte nicht geprüft werden, da bei dieser Konzentration eine Gerinnung des Mediums nicht erfolgte und so die Herstellung der Deckglaskulturen unmöglich war. Die Dauerzüchtung des Knochenmarkes gelang mit Hepanovin (1 : 400 bis 1 : 4000000) leichter als bei den Kontrollen. Nach 26 Tagen waren noch eine bessere Wachstumstendenz

und breitere Wachstumszonen als bei den unbehandelten Kulturen erkennbar. Trotz dieser offensichtlichen Förderung des Knochenmarkswachstums in vitro ließen sich die gefundenen Werte statistisch

Abb. 5. 4 Tage alte Kultur mit Hepanovin 1 : 40

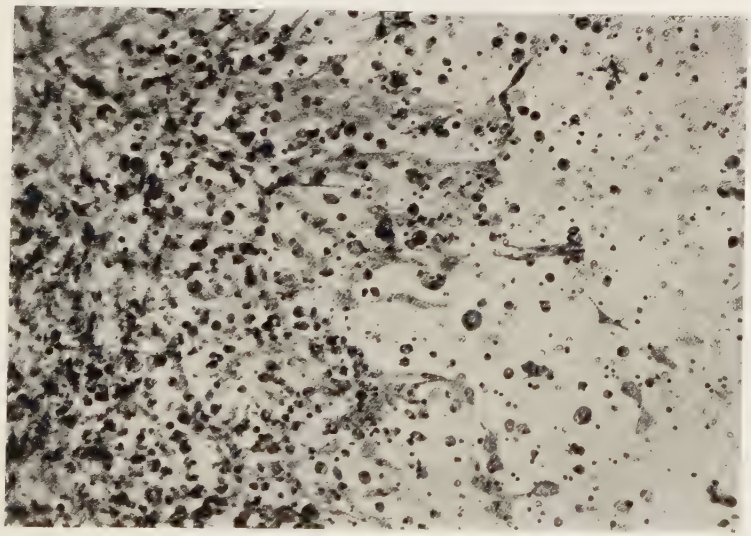


Abb. 6. 4 Tage alte Kultur mit Hepanovin 1 : 4000

nicht sichern, da die amöboid beweglichen Rundzellen nicht immer einen so dichten Saum wie die Spindelzellen um das Mutterstück bildeten, sondern oft sehr weit ausgewandert waren und beim Projizieren der Kulturen nicht zur Darstellung kamen, so daß die Meßwerte zum Teil

erhebliche Schwankungen aufwiesen. Es besteht aber bei Betrachtung der mikroskopischen Präparate kein Zweifel an der proliferations- und reifungsfördernden Wirkung des Hepanovin, die sich in der verzögerten

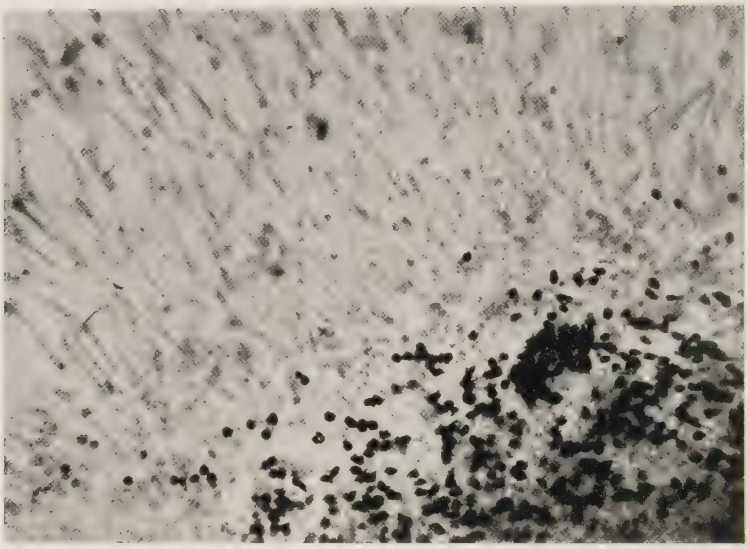


Abb. 7. 4 Tage alte Kultur mit Hepanovin 1 : 4000. Ansammlung von Mastzellen am Rande des Mutterstückes

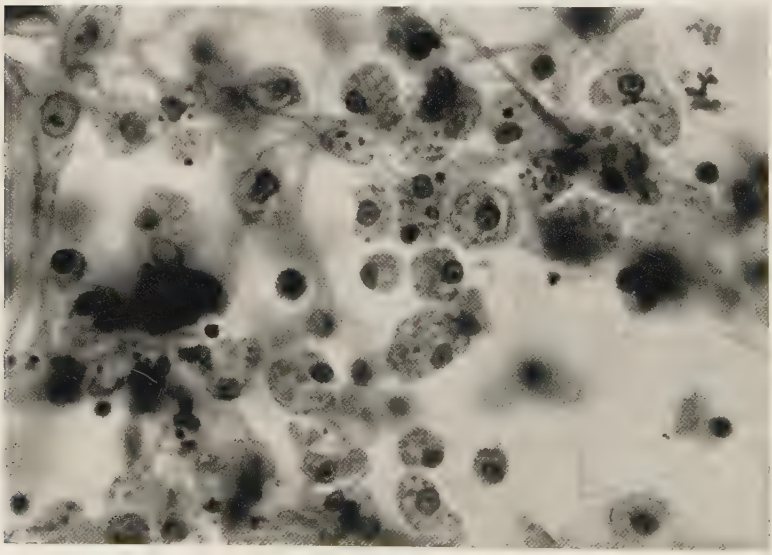


Abb. 8. 4 Tage alte Kultur mit Nucleotrat 1 : 40 bei stärkerer Vergrößerung, Stammzellen und Makrophagen in der Wachstumszone

Entdifferenzierung der in vitro wachsenden Knochenmarkszellen deutlich manifestiert.

In einer weitern Versuchsreihe wurde in 392 Gewebekulturen die Wirkung des Präparates *Nucleotrat*, eines Pentosenucleotids, auf das Knochenmark geprüft. Weniger die Größe der Wachstumszonen, die sich nur selten signifikant von denen der Kontrollkulturen unterschieden, als ihre Zellzusammensetzung waren für den Effekt charakteristisch. Es bestand eine deutliche Vermehrung der Granulocyten, die bis in die zweite Woche anhielt. Starke Nucleotratkonzentrationen (1 : 40 bis 1 : 400) verursachten überwiegend eine Proliferation der Rundzellen (Abb. 8), während niedrigere Konzentrationen auch eine Aussprossung der Spindelzellen anregten. In allen Versuchskulturen waren die amöboid beweglichen Granulocyten weit in die Peripherie ausgewandert, wobei die Neutrophilen stärkere Degenerationszeichen aufwiesen als die Eosinophilen. Nach dem Umsetzen wuchsen die Nucleotratkulturen besser als die Kontrollen, unterlagen aber ebenfalls, wenn auch verzögert, dem für alle Gewebekulturen typischen Entdifferenzierungsprozeß. Eine Dauerzüchtung von differenzierten Rundzellen gelang mit Nucleotrat ebensowenig wie mit den anderen getesteten Substanzen.

Diskussion

Bei Bemühungen, eine Substanz zu finden, mit der sich eine Proliferation und Differenzierung der Knochenmarkszellen erzielen ließe, erwiesen sich die vier getesteten Purine in ausgedehnten Untersuchungen hierfür als nicht geeignet. Meist war nach Zusatz dieser Stoffe zu den Knochenmarkskulturen eine mehr oder minder starke Wachstumshemmung zu beobachten, die in Abhängigkeit von der Konzentration des Purinkörpers stand. Lediglich mit 1.7-Dimethylhypoxanthin 1 : 40000 wuchsen die Kulturen breiter als die gleichaltrigen Kontrollen aus und zeigten darüber hinaus nach dem Umsetzen eine größere Vitalität der spindeligen Zellen, die bis zu 47 Tagen in den Knochenmarkskulturen unvermindert nachweisbar waren. 2-Methyl-9-Äthyl-10-Oxyhomopurin und 2-Methyl-9-Allyl-10-Oxyhomopurin scheinen dagegen das Auswachsen der typischen Spindelzellen zu hemmen. Statt dessen ist eine Vermehrung von großen und kleinen Rundzellen zu beobachten, die sich zum Teil als Eosinophile differenzieren lassen, zum Teil sicher noch undifferenzierte Stammzellen sind. Nur bei sehr schwachen Konzentrationen traten in den Kulturen neben den zahlreichen, zum Teil in Mitose befindlichen Rundzellen, die bis zu 18 Tagen gefunden werden konnten, spindelige Elemente auf. Da diese runden Zellen sehr dicht um das Mutterstück lagen, die in die Peripherie ausgewanderten Granulocyten aber bei der Projektion der Kulturen nicht vollständig erfaßt werden konnten, wurden die Wachstumszonen stets kleiner als bei den Kontrollkulturen gemessen.

Zweifellos ist die Wirkung des Leberhydrolysats Prohepar erheblich stärker als die der untersuchten Purine. Die zum Zellwachstum nötigen Aminosäuren und anderen Aufbaustoffe scheinen in dem Hydrolysat in einem optimalen Mischungsverhältnis vorzuliegen, so daß sich fast stets eine signifikante Proliferationssteigerung fand, die sowohl die Rundzellen als auch die Spindelzellen betraf. Dabei bestand offenbar eine Abhängigkeit von der Konzentration des Leberhydrolysates dahingehend, daß höhere Konzentrationen mehr die Rundzellenbildung förderten, während das Spindelwachstum nur bei schwächeren Konzentrationen neben der Rundzellenauswanderung einsetzte. Diese wachstumsfördernde Wirkung manifestiert sich nicht nur in der erheblichen Verbreiterung der Wachstumszonen, sondern ist auch aus der Vitalität der Kulturen nach dem Umsetzen zu ersehen, die sich gegenüber den Kontrollkulturen durch eine deutlich verlängerte Lebensdauer auszeichneten.

Die Wirkung von Leberextrakt bzw. Vitamin B 12 auf das Knochenmarkswachstum in vitro ist bereits eingehend untersucht worden. So berichten Osgood u. Brownlee über eine Förderung des Wachstums und der Reifung. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Plum. Astaldi u. Baldini beobachteten dabei eine verstärkte Zellauswanderung aus dem megaloblastischen Mark, das sich unter dem Lebereinfluß normoblastisch umwandelte. Lajtha u. Callender wollen in Knochenmarkssuspensionen keine Reifung der Megaloblasten gesehen haben, wenn Perniciosaserum allein oder mit Vitamin B 12 zugegeben wurde, mit Vitamin B 12 + Magensaft oder mit Normalserum soll die normoblastische Umwandlung nach ihren Erfahrungen jedoch sehr rasch einsetzen. Sacchetti u. Parreira fanden bei ihren in vitro-Versuchen mit Vitamin B 12 eine gesteigerte Zellproliferation des megaloblastischen Knochenmarkes und eine beschleunigte Differenzierung und Reifung der unreifen Erythroblasten. In jüngster Zeit haben Swan, Reisner u. Silverman mit verschiedenen Methoden den Einfluß des Vitamin B 12 auf das Knochenmarkswachstum in vitro untersucht und bestätigten seine wachstums- und reifungsfördernde Wirkung. Eine Verstärkung des Vitamin B 12-Effektes durch den Intrinsic-Faktor war jedoch nicht zu beobachten. Diese ausführlichen Untersuchungen erübrigten eine Nachprüfung der Vitamin B12-Wirkung. Da die mitgeteilten Versuche nur die Erythropoese betrafen, interessierte die Frage, welchen Einfluß der Leberwirkstoff auf die Granulopoese ausübt. Es ist bekannt, daß Folsäure und Vitamin B 12 auf den Kernstoffwechsel einwirken und zur Synthese der Thymonucleinsäure unentbehrlich sind. Ein Mangel wirkt sich somit sowohl auf den roten als auch auf den weißen Knochenmarksanteil ungünstig aus.

Eigene Untersuchungen mit dem Kombinationspräparat Hepanovin ergaben auch bei normalem Knochenmark eine Proliferationsförderung des gesamten Explantates, die sich in einer erheblichen Vermehrung der Rundzellen äußerte, bei Zusatz geringerer Mengen aber auch das Wachstum spindeliger Zellen zuließ. Hepanovin aktiviert auch nach dem Umsetzen der Kulturen das Zellwachstum, das rascher als in den unbehandelten Kontrollkulturen wieder einsetzte und ein Weiterleben des Explantates ermöglichte. Auch trat die Entdifferenzierung der in vitro wachsenden Zellen später als gewöhnlich in Erscheinung. Darüber hinaus

konnte eine Reifung der Erythroblasten zu hämoglobinhaltigen Erythrocyten beobachtet werden.

In ähnlicher Weise wurde auch durch Nucletrat das Wachstum der Rundzellen gefördert, die in breiter Zone aus dem Mutterstück auswanderten und eine deutliche Reifungstendenz aufwiesen. Eine Dauerzüchtung sich differenzierender Rundzellen war aber mit diesem Nucleotid ebenso wenig möglich wie mit den bisher untersuchten Stoffen. Die Erfahrungen, die an über 5000 Kulturen von Menschen-, Ratten- und Meerschweinchenknochenmark gewonnen wurden, haben gezeigt, daß zwar kurzfristige Rundzellproliferationen erzielt werden können, eine Entdifferenzierung des Knochenmarkes in vitro aber nicht aufzuhalten ist. Dieser Vorgang, bei dem die meisten Mesenchymzellen sternförmige bis spindelige Gestalt annehmen, dürfte durch die Wachstumsbedingungen in vitro ausgelöst sein und kann als Anpassungsvorgang der Zellen an das veränderte Milieu aufgefaßt werden.

Wir haben bereits früher hervorgehoben, daß diese spindeligen Zellen nur zum Teil echte Fibroblasten sind, zum Teil aber als undifferenzierte Reticulumzellen angesehen werden müssen, da sie im Gegensatz zu den vom Bindegewebe abstammenden Fibroblasten durch eine deutliche Farbstoffspeicherung ausgezeichnet sind. Diese Isomorphie beweist also nicht, daß die spindelförmigen Zellen der Gewebekultur gemeinsamen Ursprungs sind; es darf vielmehr aus ihrem unterschiedlichen funktionellen Verhalten geschlossen werden, daß trotz der ähnlichen oder gar gleichen Form diese Zellen nicht von den gleichen Stammzellen gebildet worden sind und somit völlig verschiedene prospektive Potenzen besitzen.

Zusammenfassung

Es wird über den Einfluß von 4 Purinköpern auf das Knochenmarkswachstum in vitro berichtet: zum Teil hemmten diese das Zellwachstum, zum Teil lösten sie eine Proliferation der Rundzellen aus. Prohepar, Hepanovin und Nucleotrat steigerten die Vitalität der Knochenmarksexplantate und führten zu einer vermehrten Proliferation der Rundzellen, ohne aber die Entdifferenzierung der Knochenmarkszellen in vitro zu verhindern. Die bei diesem Prozeß auftretenden spindelförmigen Zellen werden zum Teil für undifferenzierte Reticulumzellen gehalten.

Für technische Mitarbeit sei Fräulein R. Sürth gedankt.

Literatur

Astaldi, G. M., M. Baldini e C. Frugoni: Haematologica (Pavia) **31**–**32**, 265 (1948). — Callender, S. T., and L. G. Lajtha: Blood **6**, 1234 (1951). — Duesberg, R., u. L. Friederici: Arch exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 347 (1956). Friederici, L.: Fol. haemat. (Lpz.) im Druck. — Osgood, E. E., and I. E. Brownlee: J. Amer. Med. Assoc. **108**, 1793 (1937). — Plum, C. M.: Blood **1**, 42 Special Issue (1947). — Sacchetti, G., e F. S. Parreira: Haematologica (Pavia) **36**, 1109 (1952). — Snedecor, G. W.: Statistical Methodes. Iowa State College Press 1950. — Swan, H. T., E. H. Reisner and M. Silverman: Blood **10**, 735 (1955).

Dr. L. Friederici, Mainz, Med. Poliklinik d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 182—197 (1956)

Aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen
(komm. Direktor: Doz. Dr. V. Probst)

Zur Wirkung von Megaphen auf die Rattenleber nach Schädigung durch Buttergelb

Von

K. Peters, W. Krais und H. Dorn

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. März 1956)

Über das Auftreten von Leberschädigungen nach der Verabreichung von Megaphen (Largactil)-Chlorpromazin liegen zahlreiche klinische Befunde vor[10, 16, 24, 25, 26, 36, 44, 45, 47, 50, 67, 71, 90, 102, 116, 120]. Experimentell wurden bei Hunden durch die Verabreichung von Chlorpromazin histologisch feststellbare Leberveränderungen ermittelt[123].

Es erschien nun von Interesse, die Wirkung von Megaphen auf Ratten zu untersuchen, bei denen durch die Verfütterung von Buttergelb (Dimethylaminoazobenzol) = DMAAB ein Leberschaden hervorgerufen worden war. Die Frage, ob die zusätzliche Einwirkung von Megaphen das Schädigungsbild verstärkt und den weiteren Lebensablauf der Tiere beeinflußt, stand dabei im Vordergrund der Betrachtungen.

Auf Grund der beobachteten Hemmung der Hepatombildung nach der Verfütterung von DMAAB bei hypophysektomierten Ratten[35] sowie der durch Megaphen hervorgerufenen Hypophysenhemmung[2, 3, 15, 17, 20, 48] wurde bei dem Versuch neben der Leber auch die Hypophyse histologisch untersucht.

Material und Methode

Für die Versuche wurden 185 Ratten im Alter von 4 Monaten von unserem Inzuchtstamm verwendet. Es wurden 4 Versuchsreihen aufgestellt, wobei in den Reihen I bis III 40 Männchen und 20 Weibchen und in der Reihe IV 5 Männchen enthalten waren. Die Gewichtsverteilungen in den einzelnen Reihen waren folgende:

I. 206,7 ± 30,7 g ♂
178,5 ± 20,8 g ♀
197,4 ± 31,6 g ♂ + ♀

II. 207,0 ± 29,0 g ♂
178,5 ± 18,7 g ♀
197,5 ± 31,0 g ♂ + ♀

III. 207,0 ± 34,2 g ♂
179,0 ± 25,0 g ♀
197,7 ± 32,0 g ♂ + ♀

IV. 229,5 ± 58,0 g ♂

Der Farbstoff Dimethylaminoazobenzol wurde in das Futter eingebacken. Die Farbstoffmenge betrug 1 mg in 1 g Futter. Die Zusammenstellung des Futters wird von der Herstellerfirma* wie folgt angegeben:

Weizenvollkornmehl	53,0%	Brauerei-Trockenhefe	3,5%
Gerstenvollkornmehl	15,0%	Fischmehl	2,0%
Extrah. Sojaschrot	5,0%	Luzerne-Heumehl	2,0%
Trockenrindfleisch (gemahlen)	5,0%	Knochenschrot (fein)	3,0%
Vollmilchpulver	5,0%	Norw. Dorschlebertran	3,0%
Magermilchpulver	5,0%	NaCl	0,5%

Die chemische Analyse ergab nach den Angaben:

67,27% stickstofffreie Extraktivstoffe
4,61% Asche
2,80% Rohfasern
4,13% Fett
21,19% Rohproteine

Die Tiere wurden täglich 1mal am Nachmittag gefüttert. Bis zum 100. Tag wurde pro Tier 10 g Futter gegeben. Vom 100. bis zum 150. Tag erhielten es die Tiere ad libitum. Reihe IV bekam Futter ad libitum ohne Buttergelb. Die Männchen jeder Reihe wurden in Käfigen zu 5 und die Weibchen in Käfigen zu 2 Tieren gehalten, und zwar bereits ab 4 Wochen vor dem Versuchsbeginn.

Qualität und Menge des Futters erreichte eine Schädigung der Leber, aber keine Hepatombildung. Das Verhalten der Tiere unter Megaphen konnte bei beginnender und bei bereits manifester Leberschädigung untersucht werden.

Den Tieren der Versuchsreihen II, III, IV wurde über 30 Tage täglich 1,25 mg Megaphen je 100 g Körpergewicht s.c. injiziert. Auftretende Hautnekrosen wurden täglich mit Wundpuder behandelt. Da der Megapheneffekt infolge Gewöhnung nach einigen Tagen geringer wurde, wurde die Megaphendosis nach jeweils 7 Tagen um 0,15 mg 100 g erhöht. Zu Beginn jeder Woche wurde das Gewicht jedes Tieres bestimmt; dieses galt dann für die ganze Woche als Bezugsgewicht für die zu injizierende Megaphenmenge. Megaphen [N-(3'-Dimethylamino)-Propyl-3-chlorphenothiazin] wurde aus Ampullen der Firma Bayer entnommen. Das Behandlungsschema in den 4 Versuchsreihen war folgendes:

R. I: Vom 1. Tag an Buttergelb (ohne Megaphen)
R. II: „ „ „ „ (Megaphen 1.—30. Tag)
R. III: „ „ „ „ (Megaphen 60.—90. Tag)
R. IV: Vom 1.—30. Tag Megaphen (ohne Buttergelb)

Für die Beurteilung der Versuche wurden folgende Kriterien herangezogen:

a) Gewicht: Zu Beginn und nach jeweils 30 Tagen wurde jedes Tier gewogen und das mittlere Körpergewicht für jede Versuchsreihe berechnet.

b) Überlebenszeit: Die gestorbenen Tiere wurden im prozentualen Verhältnis zu den Überlebenden ermittelt.

c) Histologische Befunde der Leber: Von den vorzeitig gestorbenen Tieren und von denen, die in Zeitabschnitten nach 100 oder 150 Tagen getötet worden waren, wurde Lebergewebe aus dem peripheren Teil des oberen Leberlappens zur histologischen Untersuchung entnommen, in Formol fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten (5—7 μ) und die Schnitte in Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Da das Bild der Leberschädigungen sehr vielfältig war, wurden mit Hilfe einer gradmäßigen Einteilung die Unterschiede statistisch ausgewertet. Als erstes Kriterium einer beginnenden Schädigung wurde das vermehrte Auftreten von pyknotischen Kernen

* Kraftfutterwerk Latz (Euskirchen, Rhld.).

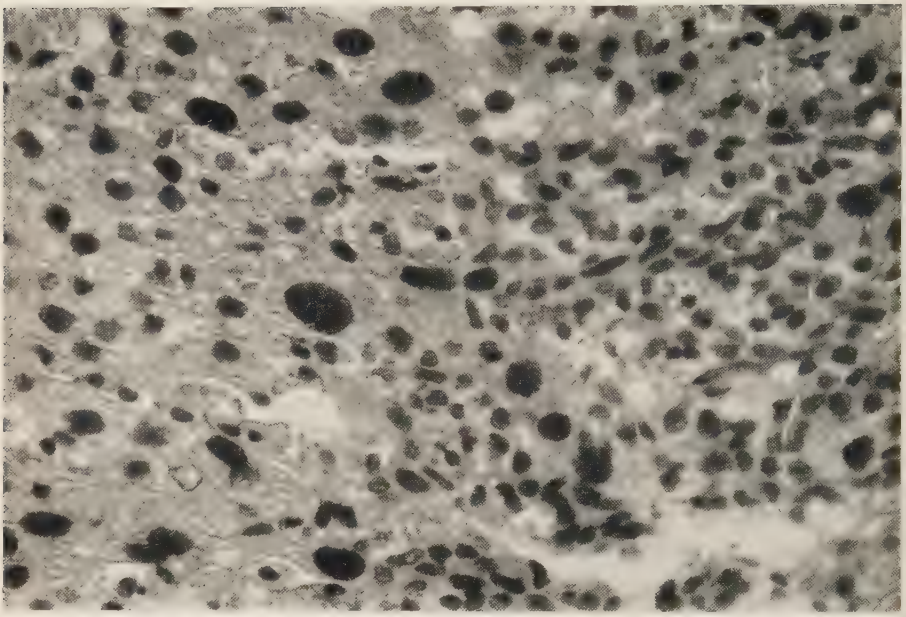


Abb. 1. Histol. Leberbefund 100 Tage nach der Verfütterung von Buttergelb unter der zusätzlichen Einwirkung von Megaphen (60.—90. Tag). Originalaufnahme 270:1; nachvergrößert 970:1

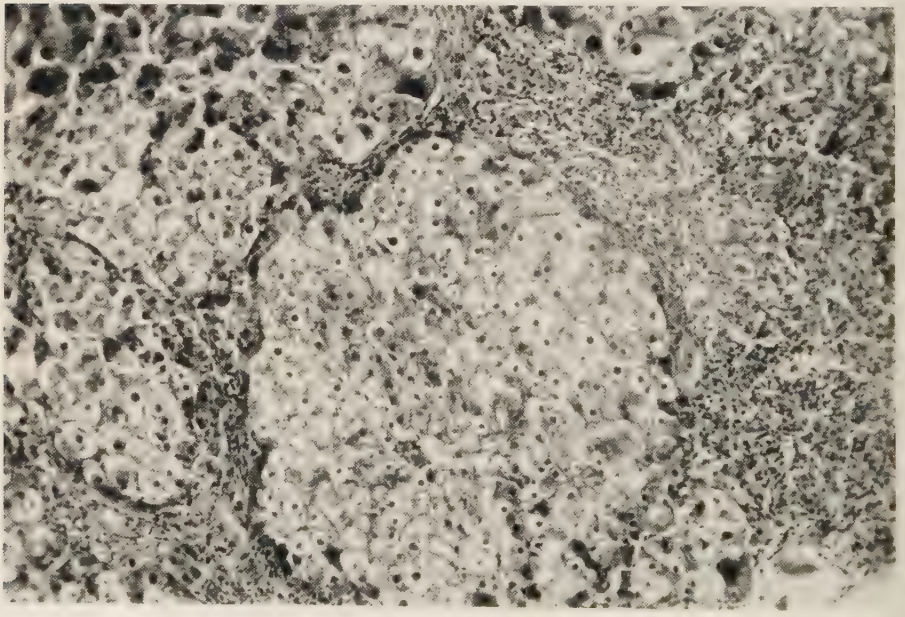


Abb. 2. Histol. Leberbefund 150 Tage nach der Verfütterung von Buttergelb. Originalaufnahme 60:1, nachvergrößert 220:1

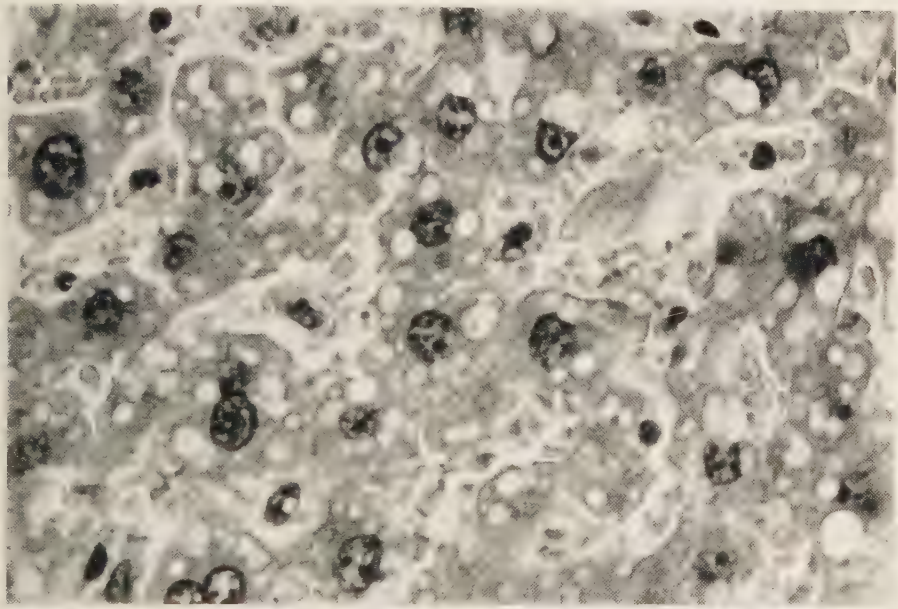


Abb. 3. Histol. Leberbefund 30 Tage nach steigenden Dosen von Megaphen. Originalaufnahme 360:1, nachvergrößet 1300:1

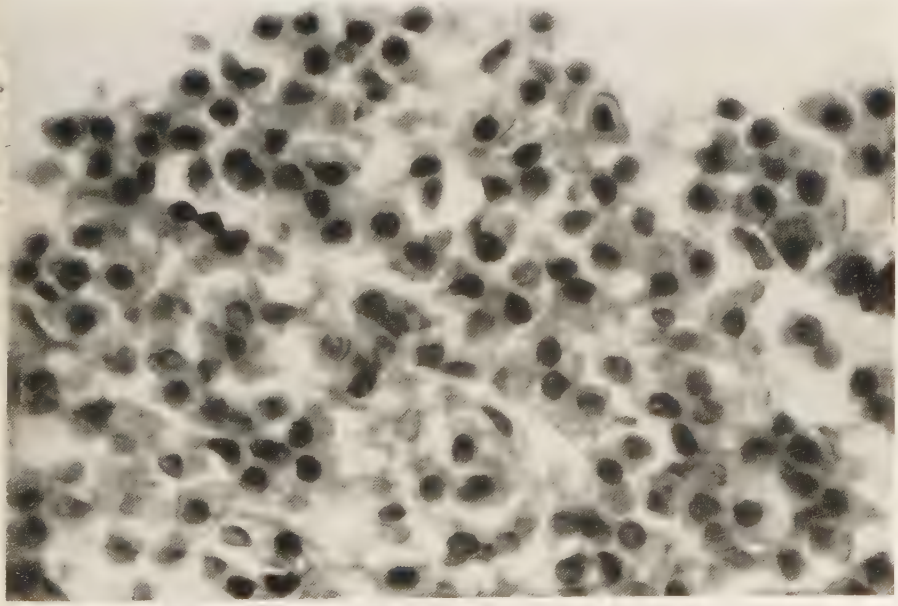


Abb. 4. Histol. Befund einer normalen Hypophyse (Vorderlappen). Originalaufnahme 360:1, nachvergrößert 1300:1

der Parenchymzellen registriert. Diese Erfassung erfolgte nur dann, wenn der Leberschnitt keine der anderen verwendeten Schädigungskriterien aufwies (siehe Abb. 1). Als nächst höherer Schädigungsgrad wurden die vorwiegend von den Gefäßen und den Capillaren ausgehenden Bindegewebswucherungen und Gallengangswucherungen sowie das Auftreten von atrophischen Gewebsbezirken registriert. Diese Befunde wurden unter dem Kriterium „beginnende Bindegewebswucherungen" zusammengefaßt. Die Fälle, in denen die reaktiven Bindegewebsveränderungen gegenüber dem vorigen Befund verstärkt hervortraten, wurden für sich erfaßt und in der Rubrik „starke Bindegewebswucherungen" aufgeführt. Die unter diesem Kriterium zusammengefaßten Präparate zeigten häufig Azini, die von lymphocytär

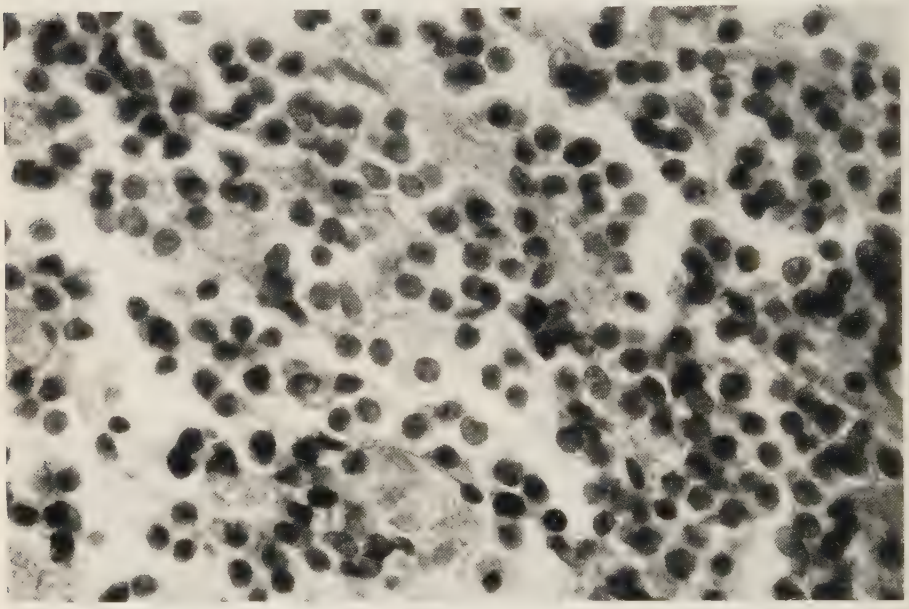


Abb. 5. Histol. Befund einer Hypophyse 100 Tage nach der Verfütterung von Buttergelb unter zusätzlicher Einwirkung von Megaphen (1.—30. Tag), (Vorderlappen). Originalaufnahme 360:1 nachvergrößert 1300:1

infiltriertem Bindegewebe umgeben waren (Abb. 2). Als weiteres Kriterium wurden die cystisch veränderten Leberschnitte erfaßt. Das Auftreten von nekrotischen Gewebebezirken wurde als schwerster Schädigungsgrad registriert. In der letzten Rubrik ist das Auftreten von vacuolisiertem Cytoplasma der Parenchymzellen aufgeführt (Abb. 3).

d) Histologische Befunde der Hypophyse: Auf eine spezifische Färbung der Hypophysenschnitte wurde verzichtet, da mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosinfärbung die Unterscheidung zwischen normalen funktionstüchtigen Hypophysen (Abb. 4) und den atrophisch veränderten Hypophysen (Abb. 5) deutlich zu erkennen war.

Die histologische Auswertung der Präparate wurde so durchgeführt, daß die Schnitte der laufenden Nummer nach ausgewertet wurden und es somit nie bekannt war, zu welcher Versuchsserie das jeweilige Präparat gehörte. Ein subjektiver Fehler dürfte somit bei unseren Versuchsergebnissen weitgehend auszuschließen sein.

Ergebnisse

A. Das Verhalten der mittleren Körpergewichte in den einzelnen Versuchsreihen

Der Verlauf der mittleren Körpergewichte der Tiere in den verschiedenen Versuchsreihen ist in der Abb. 6 dargestellt. Die mittleren Gewichte der Reihen I, II und III lassen erkennen, daß bis zum 100. Tag das Körpergewicht relativ gleichmäßig abgenommen hat. Innerhalb der ersten 30 Tage ist der Gewichtsverlust in der Reihe II infolge der zusätzlichen Megapheneinwirkung stärker als in den Reihen I und III.

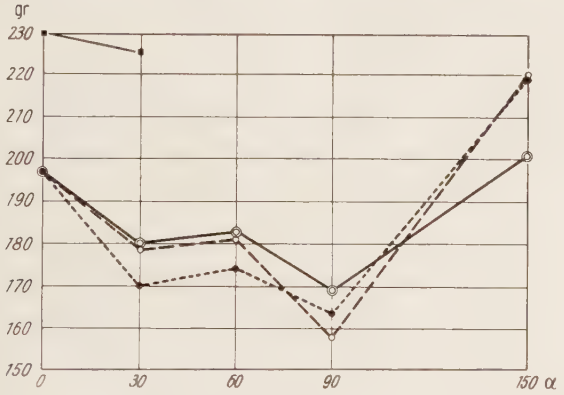


Abb. 6. Verlauf der mittleren Gewichte in den vier Versuchsreihen. Abszisse: Tage nach Versuchsbeginn. Ordinate: mittlere Gewichte in Gramm. Reihe I Buttergelb (o——o). Reihe II Buttergelb + Megaphen (1.—30. Tqg) (•------•). Reihe III Buttergelb + Megaphen (60.—90. Tag) (◎——◎) Reihe IV Megaphen (1.—30. Tag((▪——▪)

Eine Bestätigung für diese Annahme ist aus dem Verhalten der Reihe IV zu entnehmen. Trotz maximaler Fütterung nahmen diese Tiere nur auf Grund der Megapheneinwirkung in ihrem Gewicht ab. Wie bereits ausgeführt, erhielten die Tiere vom 100. bis zum 150. Tag Futter ad libitum, um den durch Buttergelb verursachten Schaden noch zu verstärken. Auf Grund dieser maximalen Fütterung ist ein starker Gewichtsanstieg zu verzeichnen, wobei die mittleren Ausgangsgewichte noch überschritten wurden.

Wenn in der Reihe III die Gewichtszunahme etwas hinter derjenigen der Reihe I und II zurückgeblieben ist, so kann dieses Verhalten auf die Nachwirkungen der Megapheneinwirkung zwischen dem 60. und 90. Tag zurückgeführt werden.

B. Überlebenszeit

In der Abb. 7 sind die Absterbekurven der drei Versuchsreihen dargestellt. Bei den nur mit Buttergelb behandelten Tieren der Versuchsreihe I starben innerhalb der Versuchsdauer von 100 Tagen 3 Tiere = 5%. Demgegenüber kamen in der Reihe II (Megaphen 1.—30. Tag)

innerhalb dieser Zeit 13 Tiere = 21% zu Tode. Die größte Todesrate wurde in der Reihe III (Megaphen 60.—90. Tag) erhalten. Hier starben von 60 Tieren 39 = 65%. Die statistische Überprüfung der Todeshäufigkeiten nach dem T-Verfahren nach v. Schelling ergab, daß zwischen der Reihe I und II noch kein signifikanter Unterschied besteht. Obwohl der für T erhaltene Wert von 2,75 die Tendenz einer vermehrten Todeshäufigkeit anzeigt. Der Wert T muß jedoch größer als 3 sein, wenn ein Zufallsergebnis ausgeschlossen werden soll. Demgegenüber ist der Unterschied zwischen der Reihe I und III signifikant. So beträgt der

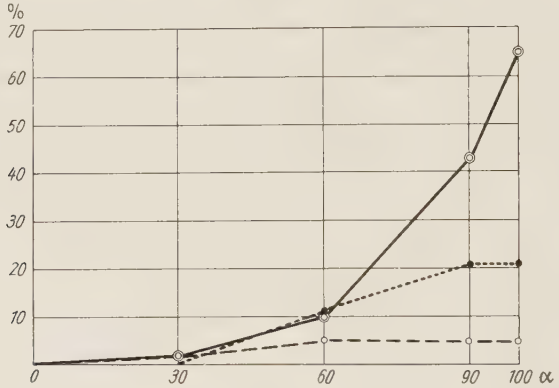


Abb. 7. Absterbefolge der Tiere in den verschiedenen Versuchsreihen. Abszisse: Tage nach Versuchsbeginn. Ordinate: Gestorbene Tiere in Prozent der Gesamtzahl der Tiere der einzelnen Reihen. Reihe I Buttergelb (o——o). Reihe II Buttergelb + Megaphen (1.—30. Tag) (•------•). Reihe III Buttergelb + Megaphen (60.—90. Tag) (◎——◎)

Wert für T beim Vergleich der Todesraten der Reihen II und III 15,3. Ein Zufallsergebnis ist also auszuschließen: Auf Grund der stärkeren Leberschädigung durch DMAAB in der Reihe III hat sich bei zusätzlicher Megapheneinwirkung ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate herausgebildet.

C. Histologische Befunde der Leber

Die Ergebnisse der histologischen Befunde sind in der Tab. 1 aufgeführt.

Nach 100 Tagen, innerhalb der Zeit die Tiere 10 g Futter = 10 mg Buttergelb pro Tag erhalten hatten, wurde das Futter ad libitum gegeben. 50 Tage nach diesem Zeitpunkt wurden die restlichen Tiere der drei Versuchsreihen getötet. Man kann mit Sicherheit annehmen, daß bis zu diesem Zeitpunkt jedes Tier 1,5 g Buttergelb erhalten hat.

Der Vergleich der nach 150 Tagen erhobenen histologischen Befunde mit denjenigen, die nach 100 Tagen erhalten wurden, läßt erkennen, daß bei den Tieren der Reihe I eine Zunahme der Leberschädigungen stattgefunden hat.

Im Gegensatz dazu läßt der Vergleich der Befunde der Reihe II nach 100 und 150 Tagen eine Verminderung der Schädigungen erkennen. Im Sinne einer Erholung kann man auch die Zunahme der Häufigkeit der beginnenden Bindegewebswucherungen deuten.

Die gleichen Verhältnisse liegen beim Vergleich der Befunde der Reihe III nach 100 und 150 Tagen vor.

Bei der Beurteilung der Leberschädigungen wurden häufig mehrere Kriterien für ein Präparat verwendet. In der Tab. 2 wurden die Häufigkeiten der *normalen* histologischen Leberbefunde ermittelt. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für eine Zunahme der Leberschädigung durch Buttergelb innerhalb des untersuchten Zeitraumes. Demgegenüber ist in der Reihe II der Schädigungsgrad geringfügig vermindert. Diese Erholungstendenz kommt in Reihe III besonders stark zum Ausdruck. Die Zunahme der Leberschädigungen in Reihe I unter alleiniger Einwirkung von DMAAB und die Stabilisierung der Schäden bzw. die Erholungstendenz nach dem Absetzen von Megaphen in den Reihen II und III kommt deutlich zum Ausdruck.

Neben dem Befund der vermehrt auftretenden pyknotischen Zellkerne in der Abb. 1 ist die zunehmende Variabilität der Kerngrößen ersichtlich, die als auffallendes histologisches Charakteristikum in der Leber nach DMAAB-Verfütterung beschrieben wird[11]. Der in der Abb. 2 dargestellte Befund entspricht weitgehend einer Pseudoazinibildung wie sie bei der Cirrhose der Leber beschrieben wird[38]. Das Auftreten von nekrotischen

Tabelle 1. *Häufigkeit der Befunde in Prozent*

Befunde nach 100 Tagen Versuchsdauer	Zahl der Tiere	verm. pykn. Kerne	begin. Bindegewebswucherungen	starke Bindegewebswucherungen	Cystenbildung	Nekrosen	Cytoplam. Vacuolisierung	atrophierte Hypophysen
R. I (ohne Megaphen)	35	0	28,6	11,4	5,7	8,5	5,7	0
R. II (Megaphen 1.—30. Tag)	38	5,2	29,0	26,0	13,0	2,6	7,9	8,1
R. III (Megaphen 60.—90. Tag)	44	19,0	35,7	16,6	16,6	4,7	9,5	32,5
Befunde nach 150 Tagen Versuchsdauer								
R. I (ohne Megaphen)	25	8,0	36,0	36,0	16,0	0	8,0	0
R. II (Megaphen 1.—30. Tag)	22	4,7	38,0	9,5	4,7	4,7	4,7	9,5
R. III (Megaphen 60.—90. Tag)	16	0	37,0	18,7	6,2	0	6,2	14,3

Gewebebezirken war relativ selten, dabei handelte es sich vorwiegend um anämische Massennekrosen. Das Präparat der Abb. 3 stammt von einem Tier, welches nur Megaphen über 30 Tage und optimal Futter erhalten hatte. Die Tiere der Reihe IV zeigten übereinstimmend den gleichen Befund. Das Auftreten der cytoplasmatischen Vacuolen war nicht auf bestimmte Gewebepartien beschränkt, sondern gleichmäßig über das ganze Gewebe verteilt. Wie die statistischen Erhebungen ergaben, wurde ein solcher Befund bei den Tieren der Versuchsreihen I, II und III nur selten wiedergefunden und wenn, dann nicht in dieser gleichmäßigen Verteilung über den ganzen Leberlappen hinweg, sondern nur in partiellen Gebieten. Da unter alleiniger Fütterung von DMAAB hyaline Tröpfchen oder Einschlüsse im Cytoplasma der Parenchymzellen beobachtet wurden[98], so erhebt sich die Frage, ob dieser bei Megaphen beobachtete Effekt bei der Kombination mit der Buttergelbverfütterung als typisch angesehen werden kann.

Tabelle 2. *Häufigkeit der Befunde in Prozent*

Normale Befunde nach 100 Tagen Versuchsdauer	Reihe I (ohne Megaphen)	51,4%
	Reihe II (Megaphen 1.—30. Tag)	34,2%
	Reihe III (Megaphen 60.—90. Tag)	16,0%
Normale Befunde nach 150 Tagen Versuchsdauer	Reihe I (ohne Megaphen)	16,0%
	Reihe II (Megaphen 1.—30. Tag)	38,0%
	Reihe III (Megaphen 60.—90. Tag)	37,5%

Zur allgemeinen Charakterisierung der histologischen Befunde kann gesagt werden, daß es sich um toxisch degenerative Prozesse im Sinne von Hepatosen handelt, die graduell schwächer oder tärker in Erscheinung treten und Übergänge bis zu Lebercirrhosen aufweisen. Parallelen zur menschlichen subakuten Leberatrophie sind häufig vorhanden. Auf die Übereinstimmung zwischen den histologischen Befunden der tierischen Leber unter der Einwirkung von Carcinogenen und denjenigen unterernährter Menschen sei hingewiesen[9].

D. Histologische Befunde der Hypophyse

Atrophische und wahrscheinlich weitgehend funktionsuntüchtige Hypophysen (Abb. 5) wurden in der Reihe I nach 100 und nach 150 Tagen nicht gefunden. Auffallend ist, daß in der Reihe II nach 100 wie nach 150 Tagen ein gleichbleibender Prozentsatz von 8—9% atrophierter Hypophysen gefunden wird (Tab. 1), das sind 70 bzw. 120 Tage nach dem Absetzen von Megaphen. Der Befund in der Reihe III nach 100 Tagen und nach 150 Tagen (Tab. 1), d. h. 10 bzw. 60 Tage nach dem Absetzen von Megaphen weist auf die langsame Funktionsaufnahme der Hypophyse hin.

Die Armut der Zellen an Cytoplasma, wie sie in der Abb. 5 zum Ausdruck kommt, ist in der ganzen Hypophyse festzustellen und nicht auf bestimmte Bezirke beschränkt. Außerdem zeigen die Zellkerne eine

weniger intensive Anfärbung des Chromatingerüstes im Gegensatz zu den Tieren mit normalen funktionstüchtigen Hypophysen (Abb. 4).

Hinsichtlich der Begriffsbildung „atrophische Hypophyse" sei bemerkt, daß wir damit den morphologischen Zustand der Zellen beschrieben haben. Eine Aussage, inwieweit exogene (schlechte Durchblutung, Permeabilitätsveränderungen) oder endogene Ursachen (Stoffwechselherabsetzung) bei der Entstehung dieses Zustandsbildes eine Rolle gespielt haben, ist damit nicht verbunden.

Diskussion

Die Befunde nach 100 bzw. 150 Tagen haben zu Ergebnissen geführt, die auf verschiedene Wirkungsmechanismen von Megaphen zurückzuführen sind.

Ergebnisse nach 100 Tagen: Die histologischen Befunde lassen erkennen, daß die alleinige Medikamentation von Megaphen über 4 Wochen bei steigender Dosis zu Leberveränderungen im Sinne einer intracellulären Verfettung und zu geringfügigen Stauungen führt. Es handelt sich dabei um Schäden, die, wie aus den vorliegenden Versuchsergebnissen zu folgern ist, reversibel sind. Die Befunde der Versuchsreihe II (Megaphen 1.—30. Tag) deuten daraufhin, daß die Einwirkung von Megaphen bei einer beginnenden Leberschädigung diesen Schaden wohl erhöht, jedoch nicht so stark, als dadurch die Absterberate der Tiere signifikant gesteigert würde. Die Gabe von Megaphen bei einer bereits vorhandenen Leberschädigung der Reihe III (Megaphen 60.—90. Tag) wirkt jedoch als zusätzliche Belastung der Leber (möglicherweise auf Grund der Biotransformation, Stoffwechselherabsetzung und ähnlichem), und führt zu einer Steigerung der Schädigungsrate und damit zu einer signifikanten Steigerung der Absterbequote.

Insofern bestätigen unsere experimentellen Ergebnisse die in der Literatur zahlreich beschriebenen klinischen Beobachtungen. Wenn bei den klinischen Fällen in der überwiegenden Mehrzahl von Retentionsikterus und Stauungserscheinungen berichtet wird, so konnten wir an Hand unseres histologischen Materials diese Erscheinungsbilder nur in einem relativ geringen Prozentsatz von 16% beobachten. Ebenso war das Auftreten einer cytoplasmatischen Vacuolisierung, wie sie bei alleiniger Megaphengabe in unseren Versuchen auftrat, im Maximum nur bei 9,5% der Fälle zu beobachten. Diese Ergebnisse sind jedoch vermutlich auf die Art des Leberschadens zurückzuführen, der in unserem Fall durch die Intoxikation mit Buttergelb hervorgerufen wurde. Die in der Literatur beschriebenen klinischen Befunde[10, 16, 24, 25, 26, 36, 44, 45, 47, 50, 67, 71, 75, 90, 92, 102, 116, 120], die einen hohen Prozentsatz von Stauungserscheinungen aufweisen, dürften vermutlich mit anderswirkenden Leberschäden zusammenhängen, wobei eine zusätzliche Kreislauf- oder Niereninsuffizienz bei der Manifestierung des Leberschadens unter Megaphen eine Rolle spielen könnte. Daß die Art des Leberschadens für die Verabreichung von Megaphen von grundsätzlicher Bedeutung ist, läßt eine Arbeit[97] erkennen, in der über günstige Ergebnisse bei der hypertrophen Lebercirrhose unter der Megaphenbehandlung berichtet wird.

Ergebnisse nach 150 Tagen: Während nach 100 Tagen die Zunahme der beginnenden oder bereits vorhandenen Leberschäden durch

Megaphen zu erörtern waren, stellen wir nach 150 Tagen geradezu eine Umkehr der Ergebnisse fest. In der Reihe I (Buttergelb ohne Megaphen) ist durch die verstärkte Farbstoffverfütterung eine deutliche Zunahme der Leberschäden festzustellen. Im Gegensatz dazu ist in der Reihe II und der Reihe III trotz der vermehrten Buttergelbfütterung eine Besserung der Leberschädigung zu beobachten. Diese Erholung ist nicht nur in der Reihe II, sondern auch bei den Tieren mit manifesten Leberschäden der Reihe III (60 Tage nach dem Absetzen von Megaphen) zu beobachten.

Als Erklärung für dieses Phänomen können die Hypophysenbefunde herangezogen werden. Während in der Reihe II am 100. Tag (70 Tage nach dem Absetzen von Megaphen) noch 8,1% der Hypophysen atrophiert sind und in der Reihe III am 100. Tag (10 Tage nach dem Absetzen) noch 32%, so ist das Ergebnis nach 150 Tagen noch eindrucksvoller. In der Reihe II sind nun nach 120 Tagen immer noch 9,5% atrophiert und in der Reihe III weist der Prozentsatz von 14,3% auf eine langsame Funktionsaufnahme der Hypophyse hin. Daß jedoch über 120 Tage nach dem Absetzen von Megaphen immer noch 8—9% der Hypophysen atrophiert sind, setzt uns in die Lage, eine Erklärung für das andersartige Verhalten der Tiere der Megaphenreihen zu geben.

Nach der Verfütterung von Buttergelb an hypophysektomierte Tiere wird kein Hepatom hervorgerufen[35]. Durch die zusätzliche Gabe von ACTH kann man jedoch bei hypophysektomierten Ratten die Hemmung der Buttergelb-Hepatombildung aufheben[101]. Der Problemkomplex Hypophyse-Carcinom ist seit vielen Jahren von zahlreichen Autoren bearbeitet worden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sind vor allem die Versuche von Interesse, die bei hypophysektomierten Ratten mit Reiztumoren durchgeführt wurden. Das Nichtauftreten von Krebs nach Benzpyrenpinselung[64] oder Methylcholantrenpinselung[89] bzw. eine Hemmung der Carcinom- oder Papillombildung nach Teer oder Benzpyrenpinselung[43] oder das verlangsamte Wachstum von Benzpyrentumoren[1] in hypophysektomierten Ratten spricht für die Beteiligung der Hypophyse bei der Bildung von Reiztumoren. Ähnliche Ergebnisse werden immer wieder berichtet[59]. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von Interesse, welche bei hypophysektomierten Mäusemännchen durchgeführt wurden. Durch zusätzliche Östroninjektionen wurde bei diesen Tieren keine Brustdrüsenentwicklung beobachtet[104, 74, 99, 22, 65]. Hinsichtlich des Verhaltens von Impftumoren bei hypophysektomierten Tieren liegen unterschiedliche Befunde vor. Während der Brown-Pearce-Tumor durch Hypophysektomie in seinem Wachstum nicht gehemmt wird[63], wird das Walker-Ca bei nichtträchtigen Ratten gehemmt[108]. In zahlreichen Arbeiten wird eine Hemmung von transplantablen Tumoren durch Hypophysektomie oder durch Zerstörung der Hypophyse beschrieben[5, 6, 100, 27, 30, 31, 76].

Hypophysenveränderungen bei Carcinomträgern und die Vermehrung der verschiedenen Zelltypen bei tumorkranken Menschen und Tieren sind immer wieder hervorgehoben worden[8, 12, 14, 19, 49, 56, 62, 70, 95, 106, 107, 110, 121].

Wenn die Krebsentstehung durch eine übermäßige Produktion von Hypophysenhormon begünstigt wird[66], so ist unseres Erachtens eine Interpretation der vorliegenden Ergebnisse im Sinne einer hypophysehemmenden Wirkung des Megaphens naheliegend.

Auf Grund unserer histologischen Untersuchungen führen wir die Stabilisierung der Leberschäden nach dem Absetzen von Megaphen auf die Hemmung der Hormonbildung in der Hypophyse zurück. Insbesondere scheint uns der Befund von Bedeutung, daß es nach dem Absetzen von Megaphen nicht zu einer vermehrten Hormonausschüttung kommt, sondern daß die Hypophyse langsam wieder in Funktion tritt.

Wenn aus den Versuchen[96] gefolgert wurde, daß Megaphen in der Zelle die Ribosenucleinsäurebildung verlangsamt, so ist aus der Beziehung zwischen RNS-Bildung und Eiweiß-Produktion[9] die Hemmung der Hormonproduktion durch Megaphen verständlich.

Die in unseren Versuchen beobachtete Hemmung der durch Buttergelb hervorgerufenen Cirrhosebildung infolge der Megaphenmedikamentation kann unseres Erachtens der Hemmung der Lebercarcinom bildung durch Hypophysektomie[35] gleichgesetzt werden.

Das Nichtauftreten von Lebercarcinomen bei den vorliegenden Versuchen bedarf einer Erörterung. Wie bereits in der Methodik mitgeteilt, erhielten die Tiere pro Tag 10 mg DMAAB. Sie hatten somit nach 100 Tagen 1 g DMAAB erhalten, die bei einer anderen Diät und bei einem anderen Tierstamm bereits genügen, um Hepatome hervorzurufen[23]. Da selbst nach weiteren 50 Tagen, in denen maximal Butter geboten wurde, und somit eine Dosis von 1,5 g DMAAB mit Sicherheit erreicht wurde, kein Carcinom histologisch festgestellt wurde, so ist ein Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Versuchen mit Buttergelb aufschlußreich.

Das Auftreten bzw. Nichtauftreten von Farbstofftumoren der Leber hat schon früh ergeben, daß die Futterzusammensetzung dabei eine wesentliche Rolle spielt. Wurde bei Ratten 2′,3-Dimethyl-4-aminoazobenzol in einer Reisdiät gefüttert[122], so traten nach 2 Monaten Lebertumoren auf. Mit einer anderen Diät war es nicht möglich, die Versuche zu reproduzieren[29, 42]. Hinsichtlich der Beeinflussung der Bildung von DMAAB-Tumoren durch die Futterzusammensetzung liegen zahlreiche Arbeiten vor[54, 55, 86, 7, 112]. Als bedeutendster Hemmer der DMAAB-Tumorbildung wurde das Riboflavin ermittelt[51, 4, 34, 39, 85], wobei es von Interesse ist, daß neben Riboflavin auch Casein im Futter vorhanden sein muß[87]. Dieser Schutzeffekt beruht dabei wahrscheinlich darauf, daß Riboflavin an der Reduktion des Azofarbstoffes beteiligt ist[91]. Das Auftreten von 2 nichtcarcinogenen Aminen in Leberschnitten von DMAAB-Ratten, die hohe Gaben von Riboflavin erhalten hatten, unterstützt diese Annahme[52, 53]. Ebenso spricht das verminderte Vorhandensein von proteingebundenem Farbstoff in der Leber von Ratten, die mit Riboflavin gefüttert wurden, für diesen Wirkungsmechanismus[80]. Während durch Thiamin, Pantothensäure oder Nicotinsäure die Tumorhäufigkeit nicht beeinflußt wird[87], wurden wenige oder keine Tumoren hervorgerufen, wenn kein Pyridoxin in der Diät enthalten war[78]. Fütterungsversuche mit einer niedrigen Proteindiät ergaben, daß die Art der Tumoren dadurch beeinflußt werden soll und man je nach Fütterung vorwiegend Hepatome, Adenocarcinome oder Cholangiome erhält[91]. Diese Annahme ist aber nicht unwidersprochen geblieben[98]. In einer Proteinmangeldiät ruft die Zugabe von Vitamin B 12 eine schnellere Tumorentwicklung hervor[21, 82]. Bei einer Zugabe von Cystin, Methionin oder Cholin zur Diät wird im allgemeinen eine Verminderung der Tumorhäufigkeit hervorgerufen[37, 39, 81, 118]. Von Interesse in Zusammenhang mit unseren Ergebnissen sind die Versuche, bei welchen man durch die Zugabe von Cholin oder Methionin zur Grunddiät zu 90% Tumoren erhielt, die Häufigkeit an ausgedehnten Cirrhosen jedoch vermindert war[119, 87, 79]. Die Häufigkeit an ausgedehnten Cirrhosen nahm zu, wenn Nicotinamid[79] oder Cystin[119] zur Diät zugegeben wurde.

Man kann aus diesen Ergebnissen schließen, daß je nach der Futterzusammensetzung die Tumorbildung durch DMAAB verlangsamt oder beschleunigt wird. Das Auftreten von Cirrhosen braucht dabei nicht unbedingt ein Charakteristikum für das spätere Auftreten von Tumoren zu sein, wenngleich ein Zusammenhang zwischen Lebercirrhose und Leberkrebs zu bestehen scheint[73]. Untersuchungen über die Wirkung einer Proteindiät (gereinigtes Casein) ergab bei einem 10–48%igen Caseinanteil die gleiche Tumorrate[87, 78, 93, 40, 41]. Bei steigendem Betrag von Casein wird auf einen Leberschutz gegen die DMAAB Vergiftung geschlossen[37].

Diätversuche mit verschiedenen Fetten ergaben, daß sowohl die Art als auch die Menge einen Einfluß auf die Tumorbildung haben[83, 84, 58, 40, 93]. Die oft verschiedenen Ergebnisse scheinen erklärbar zu sein, da die Tumorhäufigkeit von der Höhe des Betrages an Riboflavin in der Leber abhängig ist, welchen die Tiere bei der Fütterung der Fettdiät erhalten können[85, 34, 81].

Die bei unserem Futter angegebene Zusammensetzung läßt erkennen, daß es sich um ein hochwertiges Futter handelt. Da die Gewichtskurve innerhalb der ersten 100 Tage eine starke Verminderung und in den folgenden 50 Tagen eine exzessive Zunahme zeigt, so ist aus dem Nichtauftreten von Tumoren zu schließen, daß wahrscheinlich nicht nur die Qualität, sondern auch die Nahrungsmenge dabei eine Rolle spielt. Während eine eiweißreiche Kost bei der Erzeugung von Lebertumoren durch DMAAB anticarcinogen wirkt, wird bei allen anderen Tumoren das Wachstum gefördert[68]. Die anticarcinogene Wirkung der Calorienbeschränkung[115] erklärt wahrscheinlich das Nichtauftreten von Tumoren in unseren Versuchen. Wir vermuten, daß bei der begrenzten Nahrungszufuhr unter Verwendung von hochwertigem Futter die Leber stoffwechsel-physiologisch nicht so stark beansprucht wird. Im Gegensatz dazu wäre bei einem weniger hochwertigen Futter oder bei einem maximalen Futterangebot eine erhöhte Arbeitsleistung der Leber notwendig und bei zunehmender Vergiftung mit DMAAB das Auftreten von Reparationsvorgängen viel eher erforderlich. Damit wäre die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung größer.

Zusammenfassung

Durch Dimethylaminoazobenzol induzierte Leberschädigungen werden zu Beginn der Schädigung durch eine zusätzliche Megaphenmedikamentation in einem nichtbedrohlichem Ausmaß verstärkt. Bei manifestiertem Leberschaden werden durch die zusätzliche Megaphengabe Veränderungen erzeugt, die zu einer signifikanten Zunahme der Absterberate führen.

Nach dem Absetzen von Megaphen tritt auch bei verstärkter Buttergelbfütterung keine Zunahme der Leberschädigung ein, sondern es ist eine Erholungstendenz zu beobachten. Dieser Befund wird auf die Hemmung der Hypophyse durch Megaphen zurückgeführt. Histologische Untersuchungen deuten darauf hin, daß nach der in unseren Versuchen verwendeten Megaphendosierung die Hypophyse nur langsam wieder in Gang kommt und damit der Effekt einer Hormonüberproduktion nach dem Absetzen des Medikamentes entfällt. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Beziehung Hypophyse-Carcinogenese diskutiert.

Herrn Prof. Dr. W. Schmidt, Path. Inst. d. Univ. Tübingen, danken wir für seine freundliche Unterstützung bei der Beurteilung der histologischen Befunde.

Herrn Doz. Dr. A. Seher, Institut für Fettforschung, Münster i. W., danken wir für die Durchführung der quantitativen chemischen Analyse zur Bestimmung der im Futter enthaltenen Farbstoffmenge, welche die in das Futter eingebackene Buttergelbmenge bestätigte.

Nachtrag bei der Korrektur. Zur Ergänzung der berichteten Befunde wurde ein weiterer Fütterungsversuch angeschlossen. Es wurde an 20 Rattenmännchen (in Einzelkäfigen) vom Versuchsbeginn Futter ad libitum gegeben, in welchem wiederum 1 mg Buttergelb pro 1 g Futter enthalten war. Das eingegebene ebenso wie das nicht gefressene Futter wurde täglich gewogen. Bis zum 100. Fütterungstag überlebten 10 Tiere. Die mittlere Buttergelbmenge, die die Tiere innerhalb dieser Zeit aufgenommen hatten, betrug 1,47 ± 0,18 g. — Hepatome wurden bei keinem der 10 Tiere beobachtet. Histologisch war eine mehr oder weniger ausgeprägte Cirrhosebildung festzustellen. Der durch die Cirrhose bedingte Umbau in dem Lebergewebe führte bei 5 Tieren zu adenomartigen Wucherungen, die das Lebergewebe streifen- und netzförmig durchziehen. Die Veränderungen bei diesen Tieren sind nur mit Vorbehalt als Adenome zu bezeichnen, da Adenome im Sinne geschwulstartiger Knoten nicht vorhanden waren.

Die Beantwortung der Frage, inwieweit das Nichtauftreten von Hepatomen in unseren Versuchen durch das Tiermaterial bzw. durch die Futterzusammensetzung bedingt ist, bedarf weiterer Versuche.

Literatur

[1] Agate, F. J., W. Antopol, S. Glaubach, F. Agate and S. Graff: Anat. Rec. **118**, 276 (1954). — [2] Aron, E., Y. Chambon and A. Voisin: Bull. Acad Nat. Med. **137**, 417 (1953). — [3] Aron, E : Anesth. et Analg. **11**, 399 (1954). — [4] Antopol, W. and K. Unna: Cancer Res. **2**, 694 (1942). — [5] Ball, H. W., L. T. Samuels and D. I. Simpson: Amer. J. Cancer **16**, 351 (1932); **18**, 380 (1933). — [6] Ball, H. W., and L. T. Samuels: Amer J. Cancer **26**, 547 (1936); **32**, 50 (1938). — [7] Baumann, C. A.: J. Amer. Dent. Assoc. **24**, 573 (1948). — [8] Berblinger, W., u. K. Muth: Zbl.. Gynäk. **47**, 1713 (1923). — [9] Berman, C.: Primary Carcinoma of the Liver. London: Lewis 1951. — [10] Boardman, H. R.: Brit. Med. J. **2**, 579 (1954); **2**, 1327 ,1564 (1955). — [11] Brock, N., H. Druckrey u. H. Hamperl: Z. Krebsforsch. **50**, 431 (1940). — [12] Burt and Castleman: Cancer (N. Y.) **6**, 236 (1953). — [13] Caspersson, T.: Cell growth and rell function. New York 1950. — [14] Cavaliero, C.: Pathologic. (Genova) **34**, 406 (1942). — [15] Castaigne, A.: Soc. med. chir. pharm. Toulouse 1952. [16] Chesney, W. M.: Brit. Med. J. **2**. 591 (1954). — [17] Cheymol, J., J. deLeeuw et J. Oger: C. r. Soc. Biol (Paris) **148**, 1213 (1954). — [18] Ciacotto, E., S. Brena, E. Fava e F. Marocco: Minerva Med. (Torino) **1953**, 352. — [19] Close, H.: Lancet **1934**, p 733. — [20] Courviosier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamic **92**, 305 - 361 (1953). — [21] Day, P. L., L. D. Payne and J. S. Dinning: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 854 (1950). — [22] Desclin, L.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **131**, 837 (1939). — [23] Druckrey, H.: Strahlenther. **94**, 45—59 (1954). — [24] Eagles, J. B.: Brit. Med. J. **1**, 46 (1955). — [25] Earle, B. V.: Brit. Med. J. **1**, 1156 (1955). — [26] Elkes, J., and Ch. Elkes: Brit. Med. J. **2**, 560 (1954). — [27] Emge, L. A., and K. M. Murphy: Amer. J. Obstetr. **32**, 593 (1936). — [28] Engel, F. L., A. Viau, W. Coggins and W. S. Lynn: Endocrinology (Springfield, Ill.) **50**, 100 (1952). — [29] Fischer-Wasels, B.: Zbl. Path. **66**, 359 (1936). — [30] Fransen, C., and Ch. McThiermann: Amer. J. Cancer **26**. 106 (1936). — [31] Gardner, W.: Amer. J. Hyg. **23**, 415 (1936). — J. Amer. Med. Assoc. **110**, 1182 (1938). — Arch. of Path. **27**, 138 (1939). — Amer. J. Cancer **40**, H. 4 (1940). — Endocrinology (Springfield, Ill.) **28**, 53 (1941). — Cancer Res. **2**, 476 (1942); **8**, 37 (1948). — [32] Garmany, G., A. R. May and A. Folkson: Brit. Med. J. **2**, 439 (1954).

— [33] Georges, G., et J. Cahn: Anesth. et Analg. **10**, 409 (1953). — [34] Griffin, A. C., and C. A. Baumann: Cancer Res. **8**, 279 (1948). — [35] Griffin, A. C., A. P. Rinfret and V. F. Corsigilia: Cancer Res. **13**, 77 (1953). — [36] Gryfting, G.: Nord. Med. **52**, 1699 (1954). — [37] György, P., E. C. Poling and H. Goldblatt: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **47**, 41 (1941). — [38] Hamperl, H.: Lehrbuch der allg. Path. u. path. Anat. Springer 1954. — [39] Harris, P. N.: Cancer Res. **7**, 35 (1947). — [40] Harris, P. N.: Cancer Res. **9**, 602 (1949). — [41] Harris, P. N., M. E. Krahl and G. H. A. Clowes: Cancer Res. **7**, 162 (1947). — [42] Heep, W.: Frankf. Z. Path. **50**, 48 (1936). — [43] Heimann, J.: Amer. J. Cancer **33**, 423 (1938); **40**, 343 (1940). — Cancer Res. **3**, 65 (1943); **4**, 31 (1944). — [44] Hartnett, B. S.: Brit. Med. J. **1**, 1458 (1955). — [45] Hewat, J. K , P. W. W. Leach and R. W. Simpson: Brit. Med. J. **2**, 1119 (1955). — [46] Holzbauer, M., and M. Vogt: Brit. J. Pharmacol. **9**, 402 (1954). — [47] Isaakcs, B., J. G. Macathur and R. M. Taylor: Brit. Med. J. **2**, 122 (1955); **2**, 1447 (1955). — [48] Jentzer, A., N. Corboud u. A. Muller: Anaesthesist **3**, 36 (1954). — [49] Karlefors, D.: Z. Krebsforsch. **17**, 195 (1920). — [50] Keal, E. F. F. Brit. Med. J. **2**, 1501 (1955). — [51] Kensler, C. J., K. Sugiura, N. F. Young, C. R. Halter and C. P. Rhoads: Science (Lancaster, Pa.) **93**, 308 (1941). — [52] Kensler, C. J.: Cancer **1**, 483 (1948). — [53] Kensler, C. J.: J. of Biol. Chem. **179**, 1079 (1949). — [54]—Kinosita, R.: Jap. Path. Soc. Trans. **27**, 665 (1937). — [55] Kinosita, R.: Yale J. Biol. a. Med. **12**, 287 (1940). — [56] Kiyono, H.: Virchows Arch. **259**, 388 (1926). — [57] Kline, B. E.: Cancer Res. **3**, 117 (1943). — [58] Kline, B. E., J. A. Miller, H. P. Rusch and C. A. Baumann: Cancer Res. **6**, 1, 5 (1946). — [59] Kortweg, R., and F. Thomas: Amer. J. Cancer **37**, 36 (1939). — Brit. J. Cancer **2**, 91 (1948). — [60] Krais, H., H. Lehr u. W. Ries: Arch. Gynäk. **185**, 40 (1954). — [61] Krais, W., H. Lehr u. W. Ries: Arch. Gynäk. **185**, 248 (1954). — [62] Kutscherenko, B.: Z. Krebsforsch. **54**, 209 (1944). — [63] Lacassagne, A., et W. Nyka: C. r. Soc. Biol. (Paris) **122**, 747 (1936). [64] Lacassagne, A., et W. Nyka: C. r. Soc. Biol. (Paris) **121**, 822 (1936). — [65] Lacassagne, A., et A..Chamorro: C. r. Soc. Biol. (Paris) **131**, 1077 (1939). — [66] Lacassagne, A.: Oncologia (Roma) **23**, H. 3/4 (1949). — [67] Lancaster, N. P., and D. H. Jones: Brit. Med. J. **2**, 565 (1954). — [68] Lang, K.: Strahlenther. **96**, 241 (1955). — [69] Langer, E.: Z. Krebsforsch. **52**, 443 (1942). — [70] Latzka, A. v.: Z. Geburtsh. **121**, 113 (1940). — [71] Lehmann, H. E.: Nervenarzt **25**, 322 (1954). — [72] Li, C. H., H. M. Evans and D. I. Simpson: J. of Biol. Chem. **159**, 353 (1945). — [73] Lunzenauer, K.: Z. Krebsforsch. **60**, 630 (1955). — [74] Lyon, W. R., and R. I. Pencharz: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **33**, 589 (1936). — [75] Maier, C., u. J. R. Rüttner: Schweiz. med. Wschr. **1955**, 445. — [76] McEuen, L. S., and D. L. Thomson: Brit. J. Exper. Path. **14**, 384 (1933). — [77] Meidinger, F.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 1086 (1954). — [78] Miller, E. C. C. A. Baumann and H. P. Rusch: Cancer Res. **5**, 713 (1945). — [79] Miller, E. C., and C. A. Baumann: Cancer Res. **6**, 289 (1946). — [80] Miller, C. A., and J. A. Miller: Cancer Res. **7**, 468 (1947). — [81] Miller, E. C., J. A. Miller, B. E. Kline and H. P. Rusch: J. of Exper. Med. **88**, 89 (1948). — [82] Miller, E. C., A. M. Plescia, J. A. Miller and C. Heidelberger: J. of Biol. Chem. **196**, 863 (1952). — [83] Miller, J. A., B. E. Kline, H. P. Rusch and C. A. Baumann: Cancer Res. **4**, 153 (1944). — [84] Miller, J. A., B. E. Kline, H. P. Rusch and C. A. Baumann: Cancer Res. **4**, 756 (1944). — [85] Miller, J. A.: Ann. New York Acad. Sci. **49**, 19 (1947). — [86] Miller, J. A., and E. C. Miller: Cancer Res. **7**, 39 (1947). — [87] Miner, D. L., J. A. Miller, C. A. Baumann and H. P. Rusch: Cancer Res. **3**, 296 (1943). — [88] Moon, H. D., M. E. Simpson, C. H. Li and H. M. Evans. Cancer Res **10**, 297, 364, 549 (1950). — [89] Moon, H. D., M. E. Simpson and H M. Evans: Science (Lancaster, Pa.) **116**, 331 (1952). — [90] Moyer, J. H., B. Kent, R. W. Knight, G. Morris, R. Huggins and C. A. Handley: Amer. J. Med. Sci. **227**, 283 (1954).

— [91] Mueller, G. C., and J. A. Miller: J. of Biol. Chem. **185**. 145 (1950). — [92] Ommen, R. A. van, and C. H. Brown: J. Amer. Med. Assoc. **157**, 321 (1955). — [93] Opie, E. L.: J. of Exper. Med. **80**, 219 (1944). — [94] Opie, E. L.: J. of Exper. Med. **84**, 91 (1946). — [95] Ormos, J., u. B. Z. Monus: Schweiz. Z. allg. Path. **15**, 39 (1952). — [96] Peters, K.: Z. Zellforsch. **44**, 14 (1956). — [97] Petzold, H., u. J. Huth: Z. inn. Med. **9**, 742 (1954). — [98] Price, J. M., J. W. Harman, E. C. Miller and J. A. Miller: Cancer Res. **12**, 192 (1952). — [99] Reece, R. P., C. W. Turner and R. T. Hill: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **34**, 204 (1936). — [100] Reiss, M., A. Hochwald, u. H. Druchrey: Z. exper. Med. **90**, 408 (1933). — [101] Robertson, C. H., M. A. O'Neal, A. C. Griffin, and H. L. Richardson: Cancer Res. **13**, 776 (1953). — [102] Saeger, C. P.: Brit. Med. J. **1**, 882 (1955). — [103] Schaumkell, K. W.: Arch. exp. Path. u. Pharmakol. **225**, 381 (1955). — [104] Schrimpf, H., u. H. Willig: Z. Krebsforsch. **59**, 366 (1953). — [105] Schulman, M. P., and D. M. Greenberg: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 676 (1949). — [106] Selye, H., J. B. Collip and D. L. Thomson: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **32**, 1377 (1935). — [107] Smith, M. C., P. A. Slattery, M. B. Shimkin, C. H. Li ,R. Lee and W. R. Lyons: Cancer Res. **12**, 59 (1952) — [108] Solcard: Bull. Cancer **25**, 801 (1936). — [109] Steiner, P. E., and L. J. Dunham: Amer. J. Path. **19**, 1031 (1943). — [110] Stöckel, E.: Zbl. Gynäk. **57**, 2614 (1933). — [111] Strauss, E., u. J. Hiller: Med. Klin. **1954**, 1073, — [112] Sugiura, K.: J. Nutrit. **44**, 345 (1951). — [113] Sumegi, J.: Zbl. Path. **79**, 181 (1942). — [114] Talalay, P., G. M. Takano, and Ch. Huggins: Cancer Res. **12**, 302, 838 (1952). — [115] Tannenbaum, H. and H .Silverstone: Advances in Cancer Res. **1**, 451 (1953). — [116] Tillman, W. G.: Brit. Med. J. **1**, 536 (1955). — [117] Trutschel, W.: Acta haematol. (Basel) **3**, H. 5/6 (1955). — [118] White, J., and J. E. Edwards: J. Nat. Cancer Inst. **2**, 535 (1942). — [119] White, J., and J. E. Edwards: J. Nat. Cancer Inst. **3**, 43 (1942). — [120] Whitifield, A. G. W.: Brit. Med. J. **1**. 785 (1955). — [121] Wyeth, G.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **18**, 59 (1934). — [122] Yoshida,T.: Trans. Jap. Path. Soc. **23**, 636 (1933). — [123] Zaccharini, C., e G. Tasca: Acta anaesth. (Padova) **4**, 69 (1953).

Dr. K. Peters, Tübingen, Kiesäckerstr. 16

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 198—206 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Komplexbildner und aktiver Eisentransport durch die Darmwand

Von

H. Jacobi, K. Pfleger und W. Rummel

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 24. April 1956)

Höber[16] (1903) sprach die Vermutung aus, „daß das Eisen im Magen an einen lipoidlöslichen Träger gekoppelt wird, der es dann im Darm bei seiner Resorption ins Darmepithel hinein mitnimmt". Er schreibt weiter und stützt sich dabei auf Versuche von Cloetta[5] (1898): „Die Albuminatbildung oder die Bindung an ein Eiweißspaltprodukt scheint also für die Resorption des Eisens wesentlich zu sein. Liegt auch die intraepitheliale Resorption vielleicht an dieser Bindung?"

Diese Frage bleibt auch in dem Resorptionsschema von Granick[11] unbeantwortet. Es zeigt nur den *intracellulären* Eisentransport, bei dem das Apoferritin-Ferritinsystem und Oxydations- und Reduktionsvorgänge eine entscheidende Rolle spielen. Wenn wir aber danach fragen, wie das zweifach geladene Fe-Kation — das nach Heubner[15] für die Resorption vorwiegend in Frage kommt —, die *Zellmembran* penetriert, dann interessiert in diesem Fall in Analogie zu anderen Beispielen zunächst der Transport durch die Membran in die Zelle hinein (Rosenberg u. Wilbrandt[28]).

Obgleich in der Literatur (Hynes[18]; McCance u. Widdowson[25]; Goldeck u. Mitarb.[9]; Goodman u. Gillman[10]) — bis auf eine Arbeit (Hegstedt u. Mitarb[14]) — die Meinung vorherrscht, daß Aminosäuren die Fe-Resorption hemmen, verdienen in diesem Zusammenhang die Aminosäuren trotzdem besondere Aufmerksamkeit, weil sie mit Eisen Komplexe bilden, unter Umständen Chelate, bei denen die positiven Ladungen des Eisens neutralisiert sind (Martell u. Calvin[22]) und weil sie selbst einem aktiven Transport durch die Darmwand unterliegen[1, 8, 17, 23].

Wir haben deshalb unter den im Darm vorkommenden natürlichen Komplexbildnern eine Aminosäure, das Cystein und die Ascorbinsäure ausgewählt und ihren Einfluß auf die Fe-Resorption mit einer künstlichen Aminosäure, Äthylendiamintetraessigsäure (Trilon B), und Thiosulfat verglichen. Ferner wurde zur Klärung der Frage, ob es sich beim

Eisendurchtritt in Gegenwart dieser Komplexbildner durch die Darmwand um einen reinen Diffusionsprozeß oder um einen aktiven Transport handelt, die Temperaturabhängigkeit des Vorgangs am isolierten Darm studiert*.

Methodik

Versuche in vivo. Katzen wurden mit 75 mg/kg i.v. Chloralose (5% gelöst in 25%iger Urethanlösung) narkotisiert. Künstliche Beatmung. In die V. jugularis wurde zur Entnahme von Proben eine Kanüle eingebunden. An der Flexura duodeno-jejunalis beginnend wurden zwei 50 cm lange Dünndarmabschnitte durch doppelte Ligatur voneinander getrennt und je eine stumpfe Kanüle eingebunden. Nach der Präparation wurden 10 mg/kg polyäthensulfosaures Na (1%) i.v. als Anticoagulans gespritzt**.

Es wurde $Fe^{59}Cl_3$ mit einer spezifischen Aktivität von 82,5 μC/mg Eisen verwandt. Als Komplexbildner dienten l-Cystein-HCl, Trilon B (Äthylendiamintetraessigsäure), Natriumthiosulfat, l-Ascorbinsäure, SH-Glutathion und Citronensäure. Den in Wasser gelösten Komplexbildnern wurden 5 γ Fe und bei einigen zur Herstellung vergleichbarer Bedingungen noch HCl zugesetzt (s. Tab. 1a), auf ein Endvolumen von 8 cm³ mit Aqua dest. aufgefüllt und die Mischung in die Darmschlinge injiziert. — Die Messung der Aktivität in Blutproben (0,5 cm³, bei 90° C getrocknet), die in Abständen von 30 min aus der V. jugularis entnommen wurden, ergaben ein Maß für die resorbierte Eisenmenge. Wir benutzten den fensterlosen Flowcounter der Firma Tracerlab.

Versuche in vitro. In die von Fisher u. Parsons[7] angegebene Durchströmungsapparatur wurden 10 cm lange Dünndarmabschnitte (Jejunum und oberes Ileum) von Meerschweinchen eingehängt. Diese Methode ermöglicht die Entnahme von Proben aus einem geschlossenen inneren (Mucosa) und äußeren (Serosa) Kreislauf. Nach Durchtrennung des Darmes der mit Äther narkotisierten Tiere, wurden die für einen Doppelversuch benötigten Darmabschnitte abgemessen, mit 37° C warmer, sauerstoffgesättigter Tyrode durchspült und in die Enden Glaskanülen eingebunden, mit denen der Darm an die Durchströmungsapparatur angeschlossen wurde. Erst nach Ingangsetzung der Zirkulation in der Apparatur durch den durchperlenden Sauerstoff bzw. Stickstoff wurde der Darm vom Mesenterium und damit von der Blutversorgung abgetrennt. Als Durchströmungsflüssigkeit diente Tyrode (0,8% NaCl, 0,005% NaH_2PO_4, 0,02% KCl, 0,25% Glucose, 0,1% $NaHCO_3$, 0,01% $MgCl_2$, 0,02% $CaCl_2$). Der Gasdurchstrom betrug rund 3 l/min, dabei wurden rund 75 cm³/min transportiert.

Ergebnisse

Der Vergleich der untersuchten Komplexbildner an der *Katze* zeigt (Tab. 1), daß nur Cystein und Ascorbinsäure die Fe-Resorption deutlich verstärken. Bis zu 10 mg Cystein-HCl erwiesen sich dabei noch als wirksam. Äthylendiamintetraessigsäure (Trilon B) und Citronensäure haben nur einen geringen Einfluß. Das p_H in der Darmschlinge ist im Hinblick auf die Existenz der Komplexe bzw. das Löslichbleiben von nichtgebundenem Eisen von Bedeutung. Es erreicht auch nach den zum Teil mit verabfolgten Säuremengen (56,9 mg HCl) in kurzer Zeit wieder einen Wert

* Ein Teil der Ergebnisse wurde bei der 22. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Graz 1955 vorgetragen.

** Wir danken den Farbwerken Hoechst für die Überlassung der Substanz.

Tabelle 1. *Fe^{59}-Resorption bei Katzen* (Impulse/min/cm³ Blut).
In einen oberen Dünndarmabschnitt (Darm I) wurde Fe^{++} bzw. Fe^{+++} und Fe^{+++} mit Komplexbildnern gespritzt. Nach Überschreiten der maximalen Impulszahl im Blut wurde beim gleichen Tier in eine tiefergelegene Darmschlinge (Darm II) l-Cystein-HCl + Fe^{+++} injiziert

	Darm I	Darm II**
	Fe^{++} † ***	l-Cystein-HCl + Fe^{+++}
1.	52	420 (250 mg)*
2.	22	260 (250 mg)
3.	52	
	Fe^{+++} †	
4.	62	452 (250 mg)
5.	48	894 (250 mg)
	Trilon B + Fe^{+++} †	
6.	116 (100 mg)	160 (100 mg)
7.	180 (100 mg)	274 (100 mg)
8.	16 (100 mg)	254 (100 mg)
9.	158 (200 mg)	153 (100 mg)
	Thiosulfat + Fe^{+++}	
10.	24 (250 mg)	486 (250 mg)
11.	110 (250 mg)	336 (250 mg)
12.	2 (250 mg)	33 (250 mg)
	SH-Glutathion + Fe^{+++} †	
13.	46 (100 mg)	176 (50 mg)
14.	148 (250 mg)	125 (250 mg)
15.	222 (500 mg)	116 (250 mg)
	l-Cystein-HCl + Fe^{+++}	
16.	190 (100 mg)	226 (250 mg)
17.	444 (250 mg)	
18.	954 (250 mg)	
19.	107 (10 mg)	482 (30 mg)
	Ascorbinsäure + Fe^{+++} †	
20.	116 (250 mg)	420 (250 mg)
21.	208 (250 mg)	588 (50 mg)
22.	768 (250 mg)	
23.	768 (250 mg)	805 (250 mg)
24.	552 (250 mg)	181 (250 mg)
	Citronensäure + Fe^{+++}	
25.	188 (250 mg)	
26.	138 (250 mg)	

* Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Gewichtsmenge des Komplexbildners an.

** Das Maximum der Impulszahl des ersten Versuches wurde gleich 0 gesetzt. Die für Darm II angegebenen Zahlen entsprechen dem von diesem Niveau aus erreichten neuen Maximalwert.

*** Fe^{++} besagt, daß zur Überführung von Eisen in die zweiwertige Form vor Verabfolgung 500 γ KJ zugegeben wurden.

† Bei diesen Versuchen wurde eine der Cystein-HCl äquivalente HCl-Menge (56,9 mg HCl) dem Injektionsgemisch zugesetzt und die Einstellung eines gleichen wie mit Cystein-HCl erreichten p_H mit einem p_H-Meter kontrolliert.

von rund 7. Die Durchtrittsrate, die im zweiten Versuchsabschnitt erreicht wurde (auf der Tabelle mit II bezeichnet), ist nicht kleiner, obwohl hierbei ein tieferer Dünndarmabschnitt (zum größeren Teil Ileum) benutzt wurde*. Diese im zweiten Versuchsabschnitt gewonnenen Ergebnisse besitzen insofern besonderen Wert, als am gleichen Tier vorher entweder die gleiche Eisenmenge ohne Zusatz oder mit Thiosulfat bzw. einer anderen Substanz zusammen praktisch kaum oder in geringerem Ausmaß resorbiert wurde. Wenn das Eisen auch als $FeCl_3$ zugeführt wurde, wie in der Mehrzahl der mit Fe^{59} durchgeführten Untersuchungen,

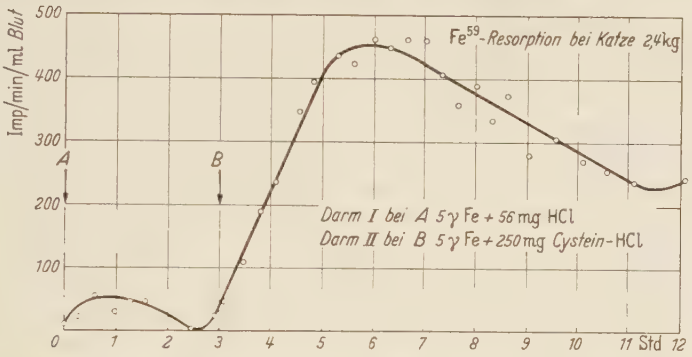


Abb. 1. Fe^{59}-Zunahme im Blut nach enteraler Verabfolgung ohne und mit Cystein am selben Tier

so hätte man dennoch eine geringgradige Resorption erwarten können, da durch die normalerweise im Darm ablaufenden Reduktionsvorgänge Fe^{+++} in Fe^{++} umgewandelt wird (Wendel[30]). Die Versuche mit Thiosulfat zeigen noch deutlicher, daß die Zweiwertigkeit des Eisens *alleine* nicht entscheidend sein kann.

Den *Verlauf* einer durch Cystein in Gang gebrachten Eisenresorption gibt die Abbildung wieder. Im ersten Versuchsabschnitt erscheinen innerhalb 3 Std nur minimale Eisenmengen im Blut, erst bei gleichzeitiger Verabfolgung von Cystein kommt es unverzüglich zu einem steilen

* In einigen Versuchen an der Katze haben wir gesondert die Frage geprüft, ob vom Rectum aus auch Eisen resorbiert wird. Dabei wurde Fe^{59} mit Träger (Ferrosulfat), d. h. also, weit höhere Fe-Mengen (1 mg) angewandt. (Durch Austausch lagen mindestens $^2/_3$ des aktiven Eisens als $^{59}Fe^{++}$ vor; Nachweis durch Ätherextraktion des Fe^{III}-Rhodanidkomplexes.) In 5 von 6 Versuchen wurden zwischen 8 und 20% (bei gleicher Berechnung wie im darauffolgenden Abschnitt) im Blut nach 3—5 Stunden gefunden. Absolut gesehen wurde also sogar mehr aufgenommen. Dabei ist noch zu bedenken, daß das abgebundene Darmstück hier nur knapp 10 cm lang war. Trotzdem wäre es ein Trugschluß, von einer besseren rectalen Resorption zu sprechen, weil 1. hier ein beträchtliches Konzentrationsgefälle bestand, 2. als Folge geringerer Pufferung bei der kleineren Schleimhautoberfläche eine stärkere Acidität herrschte und 3. die Leber, die sonst viel Eisen abfängt, umgangen wurde.

Anstieg. Im Maximum sind insgesamt 85000 Impulse, d. h., innerhalb von 2 Std 21% der verabfolgten Eisenmenge resorbiert worden. (Wir legen dabei zugrunde, daß $^1/_{13}$ des Körpergewichts der gesamten Blutmenge entspricht und vernachlässigen die aus dem Blut bereits ins Gewebe übergetretene Menge.) Es wurden dabei 5 γ Fe^{+++} verabfolgt. Das Flüssigkeitsvolumen, in dem diese Menge gelöst war, betrug zusammen mit der im Darm schon vorhandenen Flüssigkeit rund 10 cm^3 (eher mehr), so daß wir höchstens mit einer Fe-Konzentration von 50 γ-% im Darm rechnen können. Die Konzentration liegt sicherlich in Wirklichkeit deshalb noch niedriger, weil durch Adsorption an Schleim und Reste von Nahrungsbrei die gelöste Menge noch verringert wird, das bedeutet aber, daß Fe *entgegen* einem *Konzentrationsgefälle* transportiert wurde. Wir setzen dabei voraus, daß unsere Katzen eine Serumeisenkonzentration von 100 γ-% oder darüber aufwiesen (Lintzel[21] hat die Serumeisenwerte mehrerer Tierarten zusammengestellt, sie liegen alle in diesem Bereich); überdies setzen wir voraus, daß innerhalb der Versuchszeit kein Austausch stattfindet, d. h., daß kein Fe vom Blut in die abgebundene Darmschlinge ausgeschieden wird. In allen bisherigen Versuchen wurde, soweit aus der Literatur zu entnehmen, 20—100mal soviel und noch mehr Eisen verabfolgt. Hierbei liegt die Fe-Konzentration im Darm höher als im Plasma, d. h., es läßt sich nicht übersehen, inwieweit das Konzentrationsgefälle in diesen Versuchen als *treibende Kraft* sich bei der Resorption ausgewirkt hat.

Auch das *isolierte Darmpräparat* erwies sich als praktisch undurchlässig für Fe^{59} (Tab. 2). Nur in Gegenwart von *Cystein* und *Äthylendiamintetraessigsäure* tritt Eisen durch die Darmwand hindurch und erscheint auf der Serosaseite in der Suspensionsflüssigkeit. Da die Blutzirkulation ausgefallen ist, muß das Eisen nach Passieren der Mucosa am isolierten Präparat noch einen abnormen Weg zurücklegen und Muscularis und Serosa durchdringen. In den isolierten Meerschweinchendarm wurden im Mittel bei 25 Versuchen an Aktivität 216000 (147000 bis 326000) Impulse hineingegeben. Am Ende des Versuches (nach 9 Std) konnten davon in der Innenflüssigkeit (Mucosaseite) noch 138000 Impulse und in der Außenflüssigkeit (Serosaseite) 22000 Impulse (10,1% der Gesamtaktivität), insgesamt also 160000 Impulse, d. h., 73,5% der Gesamtaktivität nachgewiesen werden, so daß 26,5% an und in der Darmwand fixiert wurden.

Die *Ascorbinsäure* war wohl am isolierten Darm deswegen unwirksam, weil sie durch den durchperlenden Sauerstoff sofort aufoxydiert wurde. Der negative Ausfall der Versuche ist aber insofern interessant, als auch hier das Eisen reduziert durch die Ascorbinsäure in zweiwertiger Form vorlag. *Thiosulfat* hatte wie an der Katze keinen meßbaren Einfluß auf die Eisenresorption (zwei Versuche). Äthylendiamintetraessigsäure

ermöglichte hier in vitro im Gegensatz zum Versuch in vivo den Fe-Durchtritt. Ohne weitere Experimente läßt sich dieser Unterschied nicht erklären.

Unter *Stickstoff* geht (mit Cystein) doppelt soviel Eisen durch die Darmwand, d. h. zunächst, daß der Eisendurchtritt auch unabhängig von der Atmung erfolgen kann, was auch vom Transport anderer Ionen bekannt ist (Literatur siehe bei [29]). Die höheren Werte beruhen zum Teil wahrscheinlich auch darauf, daß in dem weitgehend O_2-freien Milieu über längere Zeit eine höhere Cysteinkonzentration erhalten bleibt.

Tabelle 2. *Fe^{59}-Durchtritt am isolierten Meerschweinchendarm.*
Die Zahlen geben die in der Außenlösung (Serosaseite) nach 7 Std gemessene Aktivität in Imp./cm³/min an. In den Darm wurden 5 γ Fe^{59} = 330000 Imp./min und 250 mg der Komplexbildner gegeben. Das p_H der Innenflüssigkeit lag auch bei den Kontrollen durch den HCl-Zusatz (56,9 mg) durchschnittlich bei 5

	37° C							27° C
Nr.	Cystein-HCl		Trilon B	Fe^{++}		Fe^{+++}		Cystein-HCl
	O_2	N_2	O_2	O_2	N_2	O_2	N_2	O_2
1.	936	1588	978	∅	∅	∅	∅	222
2.	690	1520	864	∅	∅	∅		208
3.	438	2058	956	∅	∅	∅		168
4.	432	1404	1310	∅		∅		188
5.	408	1450	508			∅		164
6.	550	2200	736					170
7.	722	950						
8.	1004	604						
9.	532	1770						
10.	600	1028						
11.		1100						
Mittel	631	1429	892					Mittel 186
	± 130	± 280	± 218					± 20

Bei *27° C* beträgt die Durchtrittsrate im Vergleich zu den Werten bei 37° nur den dritten Teil (Tab. 2). Der Prozeß der Fe-Penetration durch die Darmwand besitzt also eine verhältnismäßig hohe Temperaturabhängigkeit. Als Q_{10} ausgedrückt ergibt sich ein Wert von 3,4, er entspricht dem der Natriumpumpe[30].

Neuere unmittelbar anschließend durchgeführte Untersuchungen am Meerschweinchendarm über die Temperaturabhängigkeit des Stoffwechsels lassen uns allerdings die gebräuchliche Angabe eines Q_{10} — auch am isolierten Präparat — fragwürdig erscheinen (Jacobi u. Rummel[19]).

Diskussion

Wahrscheinlich hat die Konkurrenz von komplexbildenden Nahrungsbestandteilen, die sich im Darm um das Eisen abspielt, einen entscheidenden Einfluß auf die Resorption. Es scheint von der Natur des

Komplexbildners abzuhängen, ob Eisen zur Aufnahme gelangt oder nicht. F. Hahn[12] erwähnt in seinem Übersichtsartikel 2 Beispiele, die beweisen, daß auch *zweiwertiges* Eisen in Gegenwart bestimmter komplexbildender Substanzen *nicht* resorbiert wird (Dipyridyl, Lintzel; Weinsäure und Citronensäure, Amann). Im Hinblick auf diese Befunde kann die resorptionsfördernde Wirkung von Cystein und Ascorbinsäure nicht einfach durch ihre reduzierenden Eigenschaften entsprechend den ursprünglichen Vorstellungen Heilmeyers[14a] erklärt werden, zumal andere reduzierende Verbindungen wie Thiosulfat praktisch unwirksam waren. Außerdem konnte auch durch Äthylendiamintetraessigsäure, einem nichtreduzierenden Komplexbildner — wenn auch nur am isolierten Darm —, der Eisendurchtritt in Gang gebracht werden.

Da zu befürchten ist, daß die Mitteilung eines derartigen Befundes zum Versuch einer Verwendung von Äthylendiamintetraessigsäure für therapeutische Zwecke führen könnte, das in der Calciumtherapie bedauerlicherweise schon Eingang gefunden hat, möchten wir auf folgendes hinweisen: Äthylendiamintetraessigsäure wird im Organismus nicht abgebaut, sondern quantitativ unverändert ausgeschieden. Was sie dabei mitschleppt, ist nicht zu übersehen; der Fe^3-Komplex der Äthylendiamintetraessigsäure besitzt eine Turnoverzeit von 3 Jahren, d. h., daß das im Komplex gebundene Fe nur sehr langsam ausgetauscht wird; Äthylendiamintetraessigsäure kann deshalb eher zur Entfernung von Metallen aus dem Organismus verwendet werden[22].

In einer Arbeit von Hegstedt u. Mitarb.[14] sind als Nebenbefunde tierexperimentell gewonnene Ergebnisse niedergelegt, die besagen, daß auch durch nichtreduzierende Aminosäuren die Eisenaufnahme gesteigert werden kann. Neuere klinisch-therapeutische Erfahrungen scheinen im gleichen Sinne zu sprechen (Joergensen[20] und Remy u. Zöckler[27]). Wie unterschiedlich andererseits Komplexbildner die Eisenresorption herabsetzen können, zeigen vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Phosphaten (unveröffentlichte eigene Befunde), eine Tatsache, die bereits von der Calciumresorption bekannt ist (Borenstein u. Schwartz[4]).

Offenbar erfüllen nur einige komplexbildende Substanzen die Voraussetzungen, die nötig sind, um zusammen mit Eisen die Zellmembran zu passieren. Wir haben gefunden, daß am isolierten Darm gleichzeitig mit dem durchgetretenen Eisen 250 γ Cystein/h (bezogen auf Milligramm Trockengewicht) auf der Serosaseite nachgewiesen werden können. Die Neutralisierung der Ladungen, die Erhöhung der Lipoidlöslichkeit und die Molekülgröße dürften für die Penetrationsfähigkeit entscheidend sein. Aber daß dabei nicht lediglich eine Verbesserung der Diffusionsfähigkeit eine Rolle spielt, zeigt die starke Temperaturabhängigkeit des durch Cystein bewirkten Eisendurchtritts. Im Hinblick darauf muß auch auf die Möglichkeit einer Beeinflussung der Permeation über den Stoffwechsel

gedacht werden. Das liegt bei den Redox-Eigenschaften von Cystein- und Ascorbinsäure nahe (Conway u. Kernan[6]; Rummel[29, 3]).

Auf Grund der Reduktionskraft dieser beiden Stoffe kommt nun außerdem für die Deutung ihrer Wirkung dann, wenn sie in die Zelle eingedrungen sind, nach den Untersuchungen von Mazur u. Mitarb.[24] und Bielig u. Mitarb.[2] noch ein anderer Mechanismus in Frage. Cystein- und Ascorbinsäure setzen in vitro aus Ferritin Fe^{++} frei. Es könnte sein, daß derselbe Vorgang auch in unserem Falle in der Mucosazelle sowohl bei den Versuchen am Darm in situ wie auch am überlebenden isolierten Darm stattfindet. In Parallele zu Befunden von Mazur u. Mitarb., aus denen hervorgeht, daß Leberschnitte anaerob mehr Eisen in Ferroform freigeben, steht hier die Beobachtung, daß unter Stickstoff die durch Cystein bewirkte Fe-Resorption verstärkt abläuft. Durch die Überführung des Eisen aus der Ferri- in die Ferroform verliert der Eiweißeisenkomplex an Stabilität und Ferroionen dissoziieren ab. Auf diese Art würde also durch Cystein- bzw. Ascorbinsäure das Abhängen des Eisen besorgt und auf diese Weise ein Transport bewerkstelligt, wobei die Richtung durch andere Bedingungen gegeben sein muß.

P. F. Hahn u. Mitarb.[13] (1943) vermuteten bereits, daß die Eisenresorption kein Diffusionsprozeß ist. Die starke Temperaturabhängigkeit und der gegen ein Konzentrationsgefälle stattfindende Transport berechtigen dazu, die Eisenresorption neben anderen an Zellen ablaufenden aktiven Kationenbewegungen einzuordnen.

Zusammenfassung

1. Beim Resorptionsversuch *in vivo* zeigte sich, daß Cystein und Ascorbinsäure bei Verwendung physiologisch kleiner Eisenmengen die Aufnahme in Gang bringt. Es findet dabei ein Fe-Transport entgegen einem Konzentrationsgefälle statt. Andere Komplexbildner wie Thiosulfat, Citronensäure und Äthylendiamintetraessigsäure sind sehr viel schwächer wirksam oder unterscheiden sich nicht von Fe-Kontrollen ohne Zusatz.

2. Auch am *isolierten Darm* tritt nur mit Cystein Eisen von der Mucosaseite nach der Serosaseite über. Der Vorgang ist stark temperaturabhängig. Wenn man den Durchtritt bei 27° C mit dem bei 37° vergleicht, ergibt sich ein Q_{10}, der über 3 liegt. – Hier am isolierten Darm erweist sich auch noch Äthylendiamintetraessigsäure als wirksam. Der Fe-Transport in Gegenwart von Cystein durch die Darmwand findet auch unter anaeroben Bedingungen statt.

Literatur

[1] Agar, W. T., F. J. R. Hird and G. S. Sidhu: J. of Physiol. **121**, 255 (1953.) — [2] Bielig, H. J., u. E. Bayer: Naturwissenschaften **42**, 466 (1955). — [3] Bruns, F., W. Rummel et A. Thielke: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 258 (1952).

[4] Borenstein, M. K., and C. Schwartz: J. Nutrit. **36**, 681 (1948). — [5] Cloetta, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **38**, 161 (1898). — [6] Conway, E. J., and R. P. Kernan: Biochemic. J. **61**, 32 (1955). — [7] Fisher, R. B., and D. S. Parsons: J. of Physiol. **110**, 36 (1949). — [8] Gibson, Q. H., and G. Wisman: Biochemic. J. **48**, 426 (1951). — [9] Goldeck, H., D. Remy u. Ping-Kwan Pang: Dtsch. Arch. klin. Med. **199**, 239 (1952). — [10] Goodman, L. S., and A. Gilman: New York: Macmillan 1955. — [11] Granick, S.: Physiologic. Rev. **31**, 489 (1951). — [12] Hahn, F.: Naturf. u. Med. in Dtschl. **62**, 200 (1939—1946). — [13] Hahn, P. F., J. F. Ross, W. F. Bale and G. H. Whipple: J. of Exper. Med. **71**, 731 (1940); **78**, 169 (1943). — [14] Hegsted, D. M., C. A. Finch and T. D. Kinney: J. of Exper. Med. **90**, 147 (1949). — [14a] Heilmeyer, L., u. K. Plötner: Das Serumeisen u. die Eisenmangelkrankheit. Jena: Fischer 1937. — [15] Heubner, W.: zit. bei E. Starkenstein: Handb. exp. Pharmakol. III, 2. Berlin: Springer 1934. — [16] Höber, R.: Pflügers Arch. **94**, 338 (1903). — [17] Höber, R., and J. Höber: J. Cellul. a Comp. Physiol. **10**, 401 (1937). — [18] Hynes, M.: J. Clin. Path. **1**, 57 (1948). — [19] Jacobi, H., u. W. Rummel: Naturwissenschaften **43**, Heft 4, 88—89 (1956). — [20] Jörgensen, G.: Ärztl. Wschr. **1955**, 2, 44; **1955**, 4, 82. — [21] Lintzel W.: Erg. Physiol. **31**, 844 (1931). — [22] Martell, A. E., and M. Calvin: New York: Prentice-Hall, Inc. 1952. — [23] Matthews, D. M., and D. H. Smith: J. of Physiol. **126**, 96 (1954). — [24] Mazur, A., S. Baez and E. Shorr: J. of Biol. Chem. **187**, 492, 497 (1950); **213**, 147 (1955). — [25] McCance, B. H., and E. M. Widdowson: Nature (Lond.) **152**, 326 (1943). — [26] Moore, S., u. W. H. Stein: zit. nach Hinsberg-Lang: Med. Chemie, Urban & Schwarzenberg 1951. — [27] Remy, D., u. H. Zöckler: Blut **2**, 32 (1956). — [28] Rosenberg, Th., and W. Wilbrandt: Rev. of Cytology **1**, 65 (1952). — [29] Rummel, W.: Naturwissenschaften **40**, 277 (1953). — [30] Stämpfli, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 29 (1956). — [31] Wendel, H.: Arch. exper. u. Pathol. Pharmakol. **208**, 225 (1949).

Doz. Dr. W. Rummel, Düsseldorf, Medizinische Akademie, Pharmakologisches Institut

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 207—219 (1956)

Aus der Universitäts-Kinderklinik Freiburg im Breisgau
(Direktor: Prof. Dr. W. Keller)

Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Kaliumferricyanid*

Von
K. Betke, I. Greinacher und F. Hecker

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. April 1956)

Kaliumferricyanid ($K_3Fe(CN)_6$) reagiert quantitativ mit Hämoglobineisen, indem es das Eisen aus der zwei- in die dreiwertige Stufe überführt[1, 8, 9, 15]. Es bildet sich Hämiglobin (Methämoglobin, Hb^{III}). Lag der Blutfarbstoff als Oxyhämoglobin (O_2Hb) vor, dann wird der molekular gebundene Sauerstoff bei diesem Vorgang frei; eine Tatsache, die für die volumetrische Messung des gebundenen Sauerstoffs ausgenutzt wird[10, 22]. Die Oxydation von O_2Hb nimmt bei geeigneten Versuchsbedingungen einige Minuten in Anspruch, ist also leicht messend zu verfolgen. Bei vergleichenden Messungen fanden wir Speciesunterschiede der Oxydationsgeschwindigkeiten. Über diese Befunde soll im folgenden berichtet werden.

Material und Methodik

Oxyhämoglobinlösungen. Die für eine Prüfung erforderliche Mindestblutmenge betrug 0,1—0,2 cm³. Die Erythrocyten wurden auf der Zentrifuge 3mal mit 1,5%iger Kochsalzlösung gewaschen und mit Wasser hämolysiert. Zu dem Hämolysat wurde kolloidales Aluminiumhydroxyd in einer Menge zugesetzt, die 4—5mal das Volumen des benutzten Erythrocytenbreies ausmachte. Nach Schütteln wurde filtriert. Die resultierende vollkommen klare Blutfarbstofflösung konnte als weitgehend gereinigt und doch ungeschädigt angesehen werden[4]. — Die Blutfarbstoffkonzentration wurde nach Betke u. Savelsberg an einer Probe über Cyanhämiglobin mit dem Zeiss-Spektralphotometer bei 540 mμ gemessen. Durch Verdünnung mit Wasser wurde eine Konzentration von 105 mg-% eingestellt. Anschließend wurde $^1/_{20}$ Vol. eines 2,8 (teilweise auch 2,0) mol. Phosphatpuffers vom p_H 6,8 oder 7,0 zugesetzt, so daß endgültig eine Hb-Konzentration von 100 mg-% resultierte.

Kaliumferricyanid. Für die Versuche wurde meist eine 0,01 mol. Lösung verwendet. Diese wurde jeweils frisch aus einer 0,5 mol. Stammlösung hergestellt, die 0,25% Natriumcarbonat enthielt. Die Stammlösung wurde im Dunklen gehalten und alle drei Wochen erneuert. Verwendet wurde Kaliumferricyanid p.A. (Merck).

Versuchsvorgang. Die angegebenen Daten beziehen sich auf das zuletzt als Standardmethode angenommene Vorgehen. Prinzip: Es wird das Anwachsen der Hb^{III}-Konzentration am Anwachsen der Extinktion bei 630 mμ im Ablauf der Zeit

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

verfolgt. — 2,5 cm³ der O_2Hb-Lösung wurde in eine Cuvette von 1 cm Schichtdicke des Zeiss-Spektralphotometers pipettiert. Bei 630 mμ wurde die Extinktion (Eo) gegen Wasser als Vergleichswert gemessen. Mit einer schlanken Blutzuckerpipette wurden 0,07 cm³ der 0,01 n $K_3Fe(CN)_6$-Lösung eingeblasen; es wurde rasch zweimal aufgesaugt und wieder ausgeblasen und mit der Pipette durchmischt. Im Augenblick des Einblasens wurde eine Stoppuhr in Gang gesetzt. 15 sec später konnte die erste Ablesung des Galvanometerausschlags gemacht werden. Es wurde außerdem nach 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 und 120 sec abgelesen. Nach 3, 4 oder 8 min, d. h. zu einem Zeitpunkt, an dem sich der Galvanometerausschlag nicht mehr veränderte, wurde der Endwert (Ee) abgelesen. Er repräsentierte den Wert nach völliger Umwandlung des Blutfarbstoffs in Hb^{III}, Ee—Eo den gesamten Zuwachs an Hb^{III}. Der Prozentsatz an umgewandeltem Blutfarbstoff zu der Zeit t ließ sich aus der zugehörigen Extinktion E_t als $\frac{E_t - E_o}{E_e - E_o} \cdot 100$ berechnen.

Die durch den Zusatz von 0,07 cm³ $K_3Fe(CN)_6$-Lösung bedingte Volumenvermehrung und damit Verkleinerung von Eo wurde vernachlässigt, da sie in der Berechnung nicht ins Gewicht fiel. Der Farbwert von $K_3Fe(CN)_6$ brauchte ebenfalls nicht berücksichtigt zu werden, da er in der gewählten Konzentration bei 630 mμ unmeßbar klein ist.

Im Reaktionsansatz befindet sich bei der gewählten Anordnung eine Konzentration von $2{,}72 \cdot 10^{-4}$ Mol/l $K_3Fe(N)_6$ und $5{,}72 \cdot 10^{-5}$ Äqu./l O_2Hb (1 Äquivalent = $^1/_4$ Molekül, Äquivalentgewicht 17000). Vom Oxydans ist also das 4,75fache der für eine quantitative Reaktion erforderlichen Menge vorhanden.

Alle Untersuchungen wurden als Doppelversuche, teilweise auch als Dreifachversuche durchgeführt, und zwar so, daß in einer Versuchsreihe immer erst alle Erstversuche nacheinander und dann anschließend die Zweitversuche absolviert wurden. Für 20 ohne Auswahl herausgegriffene, im Zusammenhang durchgeführte Doppelversuche haben wir eine mittlere Streuung gegenüber dem Mittelwert von ± 1,85% Hb^{III} mit einem mittleren Fehler von ± 0,41% errechnet (für die Oxydation nach 20 sec); die Sicherheit der Einzelbestimmung war also recht gut.

Da die Ferricyanidlösung zwar in der Hauptmenge schlagartig eingebracht wird, bis zur völligen Säuberung der Pipette und Durchmischung des Cuvetteninhalts jedoch etwa 2 sec verstreichen, wurden auch noch andere Wege ausprobiert, z. B. ein Einspritzen mit einer Recordspritze unter starkem Druck durch eine sehr feine Kanüle. Dadurch wurde keine Verbesserung der Methode erzielt. Auch die versuchte photographische Registrierung des jeweiligen Standes des wandernden Galvanometerzeigers anstelle der einfachen Ablesung brachte keine Vorteile, die die erheblichen Umstände dieses Verfahrens aufgewogen hätten.

Neben O_2Hb wurde auch in einigen Fällen COHb untersucht. Hierzu verwendeten wir speziell angefertigte Cuvetten, die einen verschließbaren Einfüllstutzen besaßen. Die Blutfarbstofflösung wurde jeweils vor dem Versuch in der Cuvette mit CO durchperlt. Auf diese Weise konnte der Oxydationsablauf in einem abgeschlossenen, mit CO gefüllten Raum studiert werden. Da bei COHb die Oxydation außerordentlich langsam abläuft, mußte wesentlich mehr $K_3Fe(CN)_6$ in Reaktion gebracht werden. Die Lösung (0,6 cm³ einer 0,75 oder 1 mol. Lösung auf 4 cm³ COHb-Lösung) wurde mit einer Tuberkulinspritze und feiner Kanüle eingespritzt und die Cuvette rasch mit der Hand durchgeschüttelt. Die Auswertung geschah analog den Versuchen mit O_2H, nur wurde Eo wegen der höheren Volumenverdünnung und der stärkeren Eigenabsorption von COHb korrigiert.

Untersuchungsgut. Die Ergebnisse der Arbeit gründen sich auf die Untersuchung der Blutproben von über 50 Erwachsenen und Kindern, 28 Neugeborenen (Nabelschnurblut), 7 erwachsenen Rindern, 1 Kalb, 4 Rinderfeten (bei Schlachtung der

Muttertiere gewonnen), 2 Hirschen, 5 Schweinen, 2 Hammeln, 8 Kaninchen, 9 Meerschweinchen, 16 Mäusen und 1 Huhn. Außerdem konnten noch 3 Blutproben von Sichelzellanämie-Patienten und 1 Blutprobe eines heterozygoten Trägers der Hämoglobinanomalie C (Hb A und Hb C im Blut) untersucht werden. Herrn Prof. SINGER, Chicago, der uns diese pathologischen menschlichen Blutproben auf dem Luftweg zuschickte, möchten wir auch an dieser Stelle herzlich danken.

Ergebnisse

1. Auswertung der Versuchsergebnisse

Nach Zusatz des Oxydationsmittels setzte die Oxydation sofort mit raschem Anstieg ein und war, allmählich langsamer werdend, in wenigen Minuten beendet. Es entstand eine exponential gekrümmte Kurve

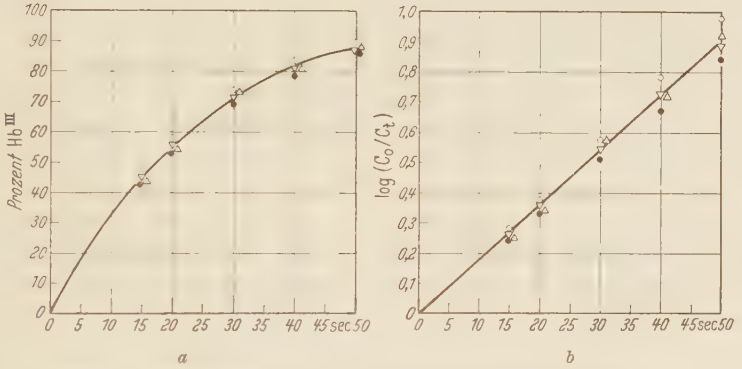


Abb. 1. Oxydation von O_2Hb des Menschen bei verschiedener Blutfarbstoffkonzentration. ○ = 62 mg-%, ▽ = 82 mg-%, △ = 100 mg-%, • = 125 mg-%. p_H 7,0, Temp. 24° C. 1a) Versuchsablauf in numerischer Darstellung, 1b) Versuchsablauf in halblogarithmischer Darstellung

(Abb. 1a). Für die zahlenmäßige Festlegung der Oxydationsgeschwindigkeit und ihren Vergleich in verschiedenen Versuchen ist diese Form der Kurve ungeeignet. Wenn die Versuchsergebnisse nach Art einer monomolekularen Reaktion ausgewertet wurden, entstand eine Gerade (Abb. 1b). Der mehr oder weniger starke Anstieg der Geraden veranschaulicht die Reaktionsgeschwindigkeit. Es wurde der Logarithmus des Quotienten Co (Menge an O_2Hb zu Beginn des Versuches)/C_t (Menge an O_2Hb im Zeitpunkt t) gegen die Zeit aufgetragen.

Die Reaktionskonstante errechnet sich, da $\ln \frac{C_o}{C_t} = k \cdot t$ ist, mit

$$k = \frac{\log \frac{C_o}{C_t} \cdot 2{,}303}{t} \ (\text{sec}^{-1}).$$

Aus Gründen der Anschaulichkeit wurde die Angabe der Halbwertzeit vorgezogen; bei vergleichenden Bestimmungen wurde das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf den Wert für Erwachsenen-O_2Hb = 1.

Auch der Ablauf der Oxydation von COHb ließ sich am ehesten nach der Art einer monomolekularen Reaktion graphisch darstellen. Es fiel aber auf, daß die ersten Werte (15—30 sec) stets ein wenig oberhalb der erhaltenen Geraden lagen (s. Abb. 6).

2. Einfluß der äußeren Versuchsbedingungen

a) Vorbereitung der O_2Hb-Lösungen. Es wurden verglichen: Einfaches Hämolysat aus gewaschenen Erythrocyten, durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd gereinigtes Hämolysat, durch Adsorption und Dialyse gereinigtes Hämolysat. Die Oxydation lief in allen drei Präparationen gleich schnell ab. Auf eine Dialyse konnte daher für die Versuche verzichtet werden. Die Reinigung durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd wurde jedoch wegen des Vorteils der vollkommenen Klarheit der O_2Hb-Lösungen beibehalten.

Tabelle 1. *Halbwertzeit der Oxydation von Erwachsenen-O_2Hb durch $K_3Fe(CN)_6$ bei verschiedenem p_H (Phosphat, 0,1 mol)*

p_H	6,1	6,58	6,88
Halbwertzeit sec . . .	8	17	31
Reaktionsgeschwindigkeit relativ, abgerundet	4	2	1

Wurde den O_2Hb-Lösungen vor Versuchsbeginn eine geringe Menge Ascorbinsäure zugesetzt (rund 1/10 der vorhandenen O_2Hb-Äquivalente), dann störte das die Oxydation nicht (im Gegensatz zu der Oxydation mit Natriumnitrit, die durch einen solchen Zusatz enorm verlängert wird[5]). Ebenso wenig war eine Vorbehandlung mit Jod (Menge dem O_2Hb äquivalent) von Einfluß.

b) Pufferung. In Bestätigung älterer eigener Befunde wurde gefunden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit fallendem p_H steigt (Tab. 1). Die p_H-Werte wurden in den fertigen O_2Hb-Lösungen mit der Glaselektrode ermittelt.

Auch die Pufferkonzentration hatte einen gewissen Einfluß. Je höher die Menge an zugesetztem Phosphat, desto rascher der Oxydationsvorgang.

c) Temperatur. Exakte Messungen der Temperaturabhängigkeit konnten mangels geeigneter Vorrichtungen nicht gemacht werden. Durch Vorkühlen oder Vorwärmen der Reaktionslösungen konnte jedoch orientierend festgestellt werden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur beträchtlich zunimmt. Alle in dieser Arbeit referierten Versuche wurden bei Zimmertemperatur vorgenommen. Sie konnte nicht konstant gehalten werden und schwankte von Versuchsreihe zu Versuchsreihe im Extrem zwischen 20° und 26° C.

d) Konzentration an $K_3Fe(CN)_6$. In der Umgebung des gewählten Konzentrationsbereichs stieg mit steigender Menge an $K_3Fe(CN)_6$ die Reaktion annähernd im gleichen Ausmaß (Tab. 2).

Bei COHb konnte ein größerer Konzentrationsbereich an $K_3Fe(CN)_6$ geprüft werden. Bei den Konzentrationen (in Mol/l) $1{,}63 \cdot 10^{-2}$, $3{,}26 \cdot 10^{-2}$,

$6{,}52 \cdot 10^{-2}$ und $11{,}74 \cdot 10^{-2}$ (d. h. also einem Verhältnis von 1:2:4:7,2) verhielten sich die Reaktionsgeschwindigkeiten wie 1:1,8:3,3:5,1.

e) Konzentration an Blutfarbstoff. Abb. 1 zeigt den Oxydationsablauf bei folgenden Konzentrationen von O_2Hb : 62, 82, 100 und 125 mg-%. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde kaum beeinflußt; immerhin lagen die Werte für die Konzentraton 125 mg-% konstant unter denen für die Konzentration 62 mg-%. In Versuchen mit COHb, bei denen ein sehr hoher $K_3Fe(CN)_6$-Überschuß bestand, war die Variation der Blutfarbstoffkonzentration bis zum 4fachen ohne Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Tabelle 2. *Halbwertzeit der Oxydation von Erwachsenen-O_2Hb bei verschiedenen Konzentrationen von $K_3Fe(CN)_6$*

	$K_3Fe(CN)_6$ mol/l	$2{,}18 \cdot 10^{-4}$	$2{,}72 \cdot 10^{-4}$	$3{,}26 \cdot 10^{-4}$
	$K_3Fe(CN)_6$-Konzentr. relativ . .	0,8	1,0	1,2
Menschl. Erwachs. O_2Hb	Halbwertzeit sec	37,5	31	26
	Reaktionsgeschwindigkeit relativ	0,83	1,0	1,19
Mäuse O_2Hb	Halbwertzeit sec	13	11	9
	Reaktionsgeschwindigkeit relativ	0,85	1,0	1,22

f) Gehalt an Hämiglobin vor Versuchsbeginn. Aus Erythrocyten, die mit $NaNo_2$ behandelt worden waren, wurde eine gereinigte, dialysierte Hb^{III}-Lösung hergestellt. Von ihr wurden verschieden große Anteile zu einer O_2Hb-Lösung gesetzt. Die Oxydationsgeschwindigkeit des Anteils an O_2Hb in jeder dieser Mischungen war gleich der einer reinen O_2Hb-Lösung (Abb. 2). Die Beimischung von Hämiglobin war also ohne Einfluß.

Zusammenfassung. Der Reaktionsablauf wird maßgebend vom p_H-Wert, von der Temperatur und von der Menge des Oxydans beeinflußt. Auch die Menge an zugesetztem Puffer ist nicht gleichgültig. Für vergleichende Untersuchungen ist daher erforderlich, diese Größen exakt konstant zu halten. Ohne Einfluß sind dagegen Differenzen in bezug auf Ausmaß der Reinigung der Hämolysate, in bezug auf den Gehalt an vor Versuchsbeginn vorhandenem Hämiglobin und auch - - allerdings in gewissen Grenzen — in bezug auf die Blutfarbstoffkonzentration.

3. Vergleichende Untersuchungen

a) Vergleich verschiedener Individuen einer Species. In Abb. 3 ist der gesamte Streubereich der Werte von 10 erwachsenen Menschen dargestellt. Für den Stand der Oxydation nach 20 sec errechnete sich eine mittlere Streuung von $\pm$ 1,16% Hb^{III} mit einem mittleren Fehler von $\pm$ 0,37%. Danach sind individuelle Differenzen der Oxydationsgeschwindigkeit der Blutfarbstoffe verschiedener Menschen unwahrscheinlich. Auch bei den bisher von uns untersuchten Tieren (möglicherweise

mit Ausnahme der Schweine, s. u.) fanden wir keinen Anhalt für das Vorkommen individueller Differenzen innerhalb einer Species.

Kinder über dem Alter von ½ Jahr verhielten sich wie Erwachsene.

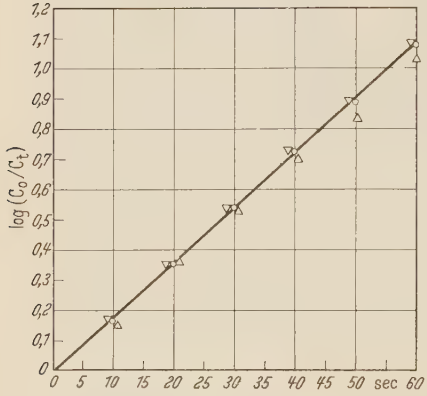


Abb. 2. Oxydation von O_2Hb des Menschen mit verschiedener Zumischung an Hämiglobin. ○ = 1,3% Hb^{III}, △ = 19,5% Hb^{III}, ▽ = 41% Hb^{III}. p_H 6,8, Temp. 20° C

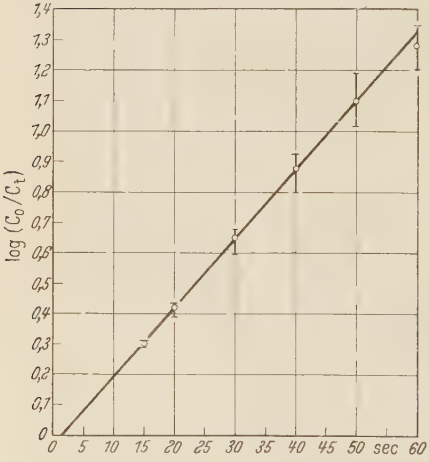


Abb. 3. Mittelwerte (○) und gesamter Streubereich der Meßwerte bei Oxydation von O_2Hb von 10 erwachsenen Menschen. p_H 7,0, Temp. 26° C

b) Vergleich verschiedener Species. Um unabhängig von kleinen Differenzen in den Versuchsbedingungen von Tag zu Tag (insbesondere von Temperaturschwankungen) zu sein, liefen in jeder Versuchsreihe 1 oder 2 Proben von menschlichem Erwachsenenblutfarbstoff als Kontrollen mit. Die Reaktionsgeschwindigkeiten konnten so als Relativwerte mit Bezug auf die Reaktionsgeschwindigkeit von menschlichem O_2Hb angegeben werden. Zwischen den Blutfarbstoffen der einzelnen Tierarten und des Menschen bestanden eindrucksvolle Differenzen. Abb. 4 zeigt die Verhältnisse für je 2 Blutfarbstoffproben von Mäusen, Kaninchen, Meerschweinchen und Menschen. Außerdem ist der Oxydationsablauf von 2 Proben menschlichen Nabelschnurblutfarbstoffs eingezeichnet. In Abb. 5 ist die Reaktionsweise der Blutfarbstoffe von Rindern und Rindsfeten (Herzblut) im Vergleich mit dem des Menschen dargestellt.

In Tab. 3 ist eine Aufstellung über die beobachteten Reaktionsgeschwindigkeiten gegeben; die Ziffern sind auf 0,5 abgerundet.

Außerdem wurden noch einzelne andere Tiere untersucht: 1 Kalb (wie erwachsene Rinder), 1 Huhn (> 3), 1 Davidhirsch (2)*, 1 Sikhahirsch (2,5)*. Blutfarbstoff von Menschen mit Sichelzellanämie verhielt sich wie normaler Blutfarbstoff[6], ebenso der eines Trägers des anomalen Hb C.

* Herrn Dr. E. Undritz, Basel, danken wir für die Überlassung dieser Blutproben.

Tabelle 3.
Oxydationsgeschwindigkeiten bei Oxydation von O_2Hb mit Kaliumferricyanid
Relative Zahlen, Mensch = 1

Mensch erw.	Mensch neugeb.	Hammel	Rind	Rind Fetus	Schwein	Kaninchen	Meerschweinchen	Maus
1	(1,5)	2,5	3	(1,5)	(2,5)	3	(3)	3

In Tab. 3 sind einige Werte in Klammern gesetzt. Das bedeutet, daß in diesen Fällen die Reaktionsgeschwindigkeiten nicht zuverlässig ermittelt werden konnten, weil die Abläufe sich nicht als Geraden darstellten, die durch den Nullpunkt gingen. Hierbei ließen sich zwei verschiedene Verhaltensweisen feststellen: 1. Abläufe, bei denen alle gemessenen Werte wohl auf einer Geraden lagen, bei denen aber diese Gerade nicht durch den Nullpunkt ging. Konstant zeigte dieses Verhalten der Blutfarbstoff des Meerschweinchens ((s. Abb. 4). In geringer Ausprägung sahen wir es auch bei manchen Rinderblutproben (s. Abb. 5).

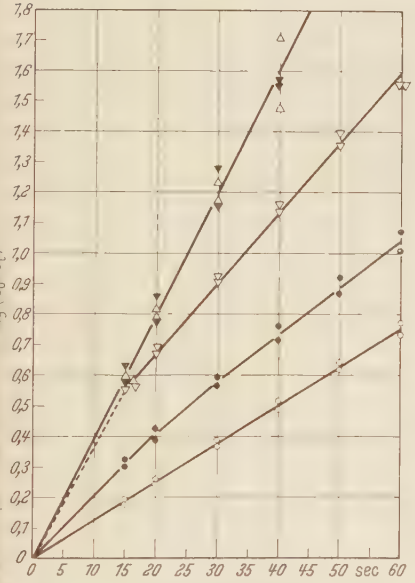


Abb. 4. Vergleichende Messung der Oxydationsgeschwindigkeit von O_2Hb bei je 2 Blutfarbstoffproben vom erwachsenen Menschen (○), vom neugeborenen Menschen (•), vom Meerschweinchen (▽), vom Kaninchen (△), von der Maus (▼)

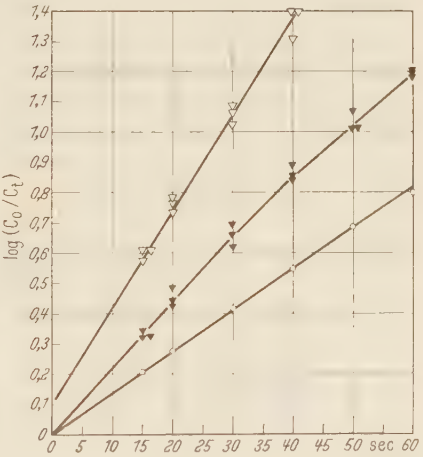


Abb. 5. Vergleichende Messung der Oxydationsgeschwindigkeit von O_2Hb bei je 3 Blutfarbstoffproben vom erwachsenen Menschen (○), vom erwachsenen Rind (▽) und vom Rinderfetus (▼)

2. Abläufe, bei denen die gemessenen Werte nur durch einen geknickten Kurvenzug zu verbinden waren. Diese Erscheinung fand sich regelmäßig bei den Blutfarbstoffen der untersuchten menschlichen Neugeborenen und der Rinderfeten. Wir beobachteten sie auch bei drei Blutproben von Schweinen, während bei den anderen Blutproben von

Schweinen die Abläufe geradlinig waren. Derartig geknickte Kurvenverläufe ließen sich experimentell dadurch erzeugen, daß eine Mischung aus einem schnell und einem langsam reagierenden Blutfarbstoff (Maus + Mensch) oxydiert wurde (s. Abb. 6).

Bei der Oxydation von COHb fanden wir diese geknickten Kurvenabläufe weder bei Neugeborenen-Blutfarbstoff noch bei der Mischung von

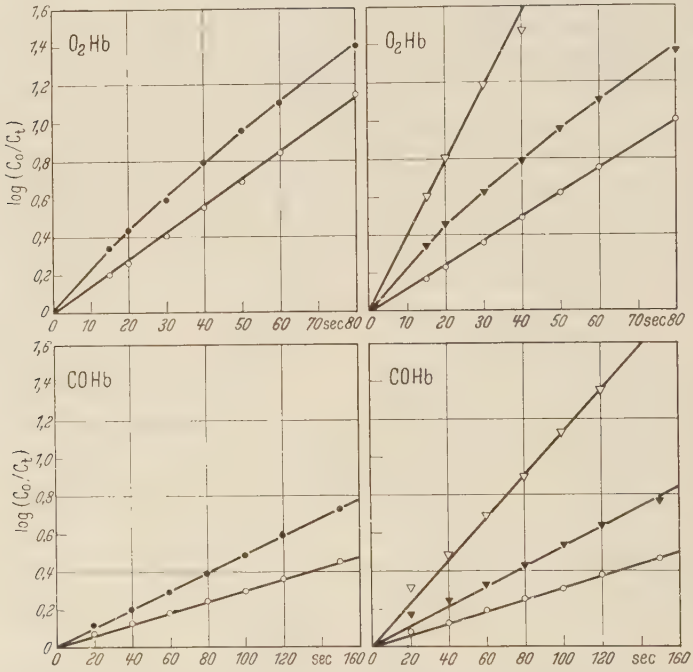


Abb. 6. Oxydationsablauf bei O_2Hb (oben) und COHb (unten). Links Vergleich von Blutfarbstoffproben des erwachsenen (○) und des neugeborenen (•) Menschen. Rechts Vergleich von Blutfarbstoffproben des Menschen (○), der Maus (▽) und einer Mischung aus beiden Blutfarbstoffen 1:1 (▼)

Mäuse- und Menschenblutfarbstoff (s. Abb. 6). Der Reaktionsablauf der Mischung war formal wie der bei den reinen Kohlenoxydhämoglobinen; die Reaktionsgeschwindigkeit entsprach einer Mittelstellung zwischen den beiden Komponenten.

Besprechung

Wenn man zu einer Lösung von O_2Hb steigende Mengen von Kaliumferricyanid gibt, dann bildet sich pro Molekül $K_3Fe(CN)_6$ ein Äquivalent Hämiglobin, d. h. zur Oxydation eines Moleküls O_2Hb sind 4 Moleküle $K_3Fe(CN)_6$ erforderlich[1, 9, 15]. Diese quantitative Beziehung ist bei allen Tierarten die gleiche, da sie vom Hämoglobineisen abhängt. Eine genauere Verfolgung der Titration zeigt allerdings, daß $K_3Fe(CN)_6$ auch mit

Anteilen der Eiweißkomponente des Blutfarbstoffs reagieren kann[18, 21]. Es handelt sich hierbei um eine relativ langsame Reaktion, von der bei den kurzen von uns angewandten Beobachtungszeiten — jedenfalls in den Versuchen mit O_2Hb — kaum Störungen zu erwarten sind.

Obwohl die quantitativen Beziehungen zwischen $K_3Fe(CN)_6$ und Hämoglobineisen bei allen Species die gleichen sind, konnten wir zeigen, daß die *Geschwindigkeit*, mit der sich O_2Hb auf diese Weise oxydieren läßt, von Species zu Species merklich differiert. Es läßt sich vorerst nicht erkennen, ob diese Differenzen irgendwelche Beziehungen zu biologischen Eigenarten der betreffenden Tiere haben. Interessant ist, daß von allen bisher von uns geprüften Blutfarbstoffen der des Menschen die geringste Oxydationsgeschwindigkeit aufwies. Wichtiger aber als die Aufzählung der einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten scheint uns die Tatsache zu sein, daß sie bei jeder Tierart eine recht scharf definierte und *reproduzierbare Größe* darstellt.

Da es sich gezeigt hat, daß die Oxydationsgeschwindigkeit recht unempfindlich gegenüber dem Reinigungsgrad der Hämoglobinlösungen ist, darf geschlossen werden, daß die beobachteten Differenzen tatsächlich speciesspezifische Eigenschaften der verschiedenen Blutfarbstoffe repräsentieren und nicht etwa durch irgendwelche andere den Lösungen beigemischte Substanzen bedingt sind.

Der formale Ablauf der Oxydation war am besten nach der Gesetzmäßigkeit einer monomolekularen Reaktion darstellbar. Damit steht in Einklang, daß sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei Variation der Hb-Konzentration kaum änderte. Wurde der $K_3Fe(CN)_6$-Überschuß hoch genug gewählt, wie im Falle der Oxydation von COHb, dann war tatsächlich die Oxydationsgeschwindigkeit von der Blutfarbstoffkonzentration unabhängig. Es handelt sich offensichtlich um eine der in biologischen Systemen so häufig beobachteten pseudomonomolekularen Reaktionen. Im Reaktionsansatz laufen 4 verschiedene Vorgänge ab:

$$\underset{\text{(Assoziation)}}{\overset{+O_2}{\rightleftharpoons}}\ \underset{\text{(Dissoziation)}}{\overset{-O_2}{}}$$

$$Hb^{II} \qquad O_2\,Hb^{II}$$

$$\text{(Oxydation)} \quad | \; -e$$

$$Fe(CN)_6''' \xrightleftharpoons{+e} Fe(CN)_6''''$$

$$\downarrow$$

$$Hb^{III}$$

1. und 2.: Assoziation und Dissoziation von O_2 und Hb. Das Gleichgewicht dieses Vorganges ist bei Anwesenheit von Luft von normalem

Atmosphärendruck soweit nach rechts verschoben, daß der Blutfarbstoff im wesentlichen als O_2Hb vorliegt.

3. Die Reaktion $Hb^{II} \rightarrow Hb^{III}$, also die Oxydation. Sie ist in vitro spontan irreversibel. Sie ist nur möglich, wenn das Eisen keinen molekularen Sauerstoff trägt.

4. Die Reduktion von Ferricyanid zu Ferrocyanid.

Wenn man sauerstofffreies Hb^{II} mit $K_3Fe(CN)_6$ reagieren läßt, geschieht die Oxydation schlagartig; jedenfalls läuft sie so schnell ab, daß sie in einer Versuchsanordnung, wie sie hier benutzt wurde, nicht meßbar ist[2]. Die Assoziationsgeschwindigkeit von Hb^{II} und O_2 zu O_2Hb ist außerordentlich hoch[12]. Wesentlich langsamer läuft die Dissoziation von O_2Hb zu Hb und O_2 ab[11]. Sie ist aber Vorbedingung dafür, daß überhaupt eine Oxydation zu Hb^{III} stattfinden kann, da nur sauerstofffreies Hb^{II} oxydierbar ist[8, 14]. Es leuchtet daher ein, daß die Dissoziation als offensichtlich langsamster Vorgang den formalen Ablauf der Reaktion bestimmt; die tatsächliche Geschwindigkeit hängt dann weiter von dem Verhältnis der Geschwindigkeiten der Oxydation einerseits und der Rekombination des durch Dissoziation entstandenen Hb^{II} mit O_2 zu O_2Hb andererseits ab.

Die Sauerstoffdissoziation ist — mit gewissen Korrekturen[20] — ein monomolekularer Vorgang[11]. Ihre Abhängigkeit von Temperatur[11], p_H[11], Salzkonzentration[12] erklärt wenigstens zu einem Teil die gefundenen Abhängkeiten der Oxydationsgeschwindigkeit von diesen Größen. Hinzu kommt, daß die Abhängigkeit des Redoxpotentials $Hb^{II} \rightleftarrows Hb^{III}$ von Temperatur und p_H in die gleiche Richtung wirkt[13, 16]. Die Assoziationsgeschwindigkeit des O_2 mit Hb^{II} ist dagegen unabhängig von der Temperatur, p_H und Salzkonzentration[12].

Die Speciesdifferenzen der Oxydationsgeschwindigkeiten von Oxyhämoglobinen könnten ihre Wurzel sowohl in Differenzen der Sauerstoffassoziation als auch in solchen der Dissoziation oder auch in solchen der eigentlichen Oxydation des Hb-Eisens haben. Da direkte Messungen dieser Vorgänge schwierig sind, existieren nur wenige Unterlagen, die man zu einer Entscheidung der Frage heranziehen könnte. Nach Untersuchungen von Laszt ist es unwahrscheinlich, daß wesentliche Speciesdifferenzen in bezug auf die Geschwindigkeit der Sauerstoffassoziation bestehen. Auch für den Übergang von Hb^{II} zu Hb^{III} liegen bisher nur Angaben vor, die keine Speciesdifferenzen anzeigen. Havemann fand bei Pferd und Rind das Redoxpotential $Hb^{II} \rightleftarrows Hb^{III}$ identisch. In eigenen Untersuchungen wurde die Geschwindigkeit der Reduktion von Hb^{III} zu Hb^{II} bei Nabelschnur- und Erwachsenenblutfarbstoff des Menschen nicht different gefunden[3], was die Schlußfolgerung erlaubt, daß wahrscheinlich auch der umgekehrte Vorgang, die Oxydation, nicht differieren dürfte. Dagegen wurden bei eigenen Messungen der Geschwindigkeit der Dissoziation von O_2Hb zu O_2 und Hb eindeutige Differenzen zwischen Nabelschnur- und Erwachsenenblutfarbstoff des Menschen gefunden,

indem der Vorgang bei dem ersteren rascher ablief[3]. Man kann also für den Fall des fetalen und bleibenden Blutfarbstoffs des Menschen mit einiger Begründung behaupten, daß die Differenz in der Oxydierbarkeit der Oxyhämoglobine auf einer unterschiedlichen Dissoziationsgeschwindigkeit des O_2Hb beruht. Für die Differenzen zu den Tierblutfarbstoffen ist eine Analogie naheliegend, aber vorerst nicht bewiesen.

Die Oxydation einer Mischung aus einem schnell und einem langsam oxydierbaren Blutfarbstoff (Mäuse- und Menschen-O_2Hb) erfolgte mit einer intermediären Geschwindigkeit und formal insofern besonders, als der Kurvenzug in der halblogarithmischen Darstellung geknickt war (Abb. 6). Diese Kurvenform läßt sich ohne weiteres als Summation zweier mit verschiedener Geschwindigkeit unabhängig voneinander ablaufender pseudomonomolekularer Reaktionen erklären. Wir haben an anderer Stelle gezeigt, daß man den erhaltenen Kurvenzug rechnerisch in seine beiden Komponenten zerlegen kann, wobei zwei Gerade mit Steigungsmaßen erhalten werden, die denen der beiden Ausgangsblutfarbstoffe entsprechen[5]. Der Versuch mit dem Blutfarbstoffgemisch bietet eine Handhabe zur Erklärung der geknickten Kurvenform bei menschlichem Nabelschnurblutfarbstoff und dem Blutfarbstoff von Rinderfeten. Wir wissen, daß diese Blutfarbstoffe nicht einheitlich sind, sondern aus 2 Komponenten bestehen, aus fetalem Blutfarbstoff und Blutfarbstoff, wie ihn der erwachsene Organismus besitzt. Durch rechnerische Auflösung der erhaltenen Kurven in beide Komponenten ließ sich ermitteln, daß reines fetales O_2Hb des Menschen $2\frac{1}{2}$mal so rasch oxydierbar ist wie bleibendes O_2Hb. Umgekehrt war zu schließen, daß reiner fetaler Rinderblutfarbstoff sich nur halb so rasch wie der erwachsener Rinder oxydiert und etwa 1,5mal so schnell wie menschliches bleibendes O_2Hb.

Das erwähnte abweichende Verhalten einiger Blutfarbstoffproben von Schweinen könnte ebenso auf eine Uneinheitlichkeit dieser Blutfarbstoffe hinweisen. Wir haben diese Frage nicht weiter verfolgt. Ebenso können wir nicht die Besonderheit des Meerschweinchenblutfarbstoffs erklären. Mit Hilfe von Löslichkeitskurven und der Alkalidenaturierung haben wir keinen Anhalt für eine Uneinheitlichkeit des Blutfarbstoffs dieser Tiere gefunden.

Wir hatten gehofft, daß uns die Untersuchung von COHb noch eingehendere Aufschlüsse über die Kinetik des Oxydationsablaufs geben würde, weil hierbei die Geschwindigkeit niedriger ist, also der Vorgang besser studiert werden kann. Diese Hoffnung hat insofern getrogen, als bei der Oxydation von COHb neue Phänomene auftraten, die die Beurteilung störten. Einmal wich der Kurvenablauf von der monomolekularen Geraden ab: die Werte bis etwa zu 40 sec lagen stets darüber (Abb. 6), sie schwenkten dann in den Verlauf der Geraden ein und entfernten sich bei längerer Beobachtung häufig wieder etwas davon nach oben. Zum anderen

war überraschend, daß eine Mischung aus einem schnell und einem langsam reagierenden Blutfarbstoff (Mäuse- und Menschen-COHb) keinen zusammengesetzten Kurvenverlauf ergab (Abb. 6). Ebensowenig war ein zusammengesetzter Kurvenablauf bei COHb aus Nabelschnurblutfarbstoff festzustellen. Die Blutfarbstoffmischungen reagierten sozusagen als „Kollektiv" mit einheitlichem Ablauf mittlerer Geschwindigkeit. Aus der Untersuchung von Blutfarbstoffproben mit wechselndem Gehalt an fetalem Hb ließ sich durch Extrapolation schließen, daß reines fetales COHb des Menschen etwa 2½mal so rasch oxydierbar ist wie Erwachsenen-COHb[17], was mit den Verhältnissen bei O_2Hb gut übereinstimmt.

Woran die Besonderheiten des Oxydationsablaufs bei COHb liegen, ist aus unseren Versuchsergebnissen nicht zu entnehmen. Man muß in Betracht ziehen, daß bei dieser trotz hohen $K_3Fe(CN)_6$-Überschusses doch ziemlich langsam ablaufenden Reaktion schon eine Oxydationswirkung am Eiweißanteil des Blutfarbstoffs ins Spiel kommt[18, 21]. Es wäre möglich, daß ein derartiger Vorgang für die Oxydation des Hb-Eisens neue Verhältnisse schafft.

Zusammenfassung

Der zeitliche Ablauf der Oxydation von Oxyhämoglobinen verschiedener Herkunft durch Kaliumferricyanid wurde untersucht. Die Oxydationsgeschwindigkeit hatte für jede Tierart eine charakteristische und reproduzierbare Größe. Zwischen den Blutfarbstoffen mehrerer Individuen einer Species wurden keine Differenzen gefunden. Von allen bisher untersuchten Blutfarbstoffen hatte der des erwachsenen Menschen die geringste Oxydationsgeschwindigkeit.

Die Oxydation lief formal wie eine (pseudo-)monomolekulare Reaktion ab. Sie beschleunigte sich mit fallendem p_H, steigender Temperatur und steigender $K_3Fe(CN)_6$-Konzentration. Die Blutfarbstoffkonzentration und der Anteil an Hämiglobin (Methämoglobin) vor Versuchsbeginn waren ohne Einfluß auf die Geschwindigkeit.

Der für den formalen Ablauf der Oxydation verantwortliche limitierende Vorgang dürfte die Dissoziation von O_2Hb zu O_2 und Hb sein; nur sauerstofffreies Hb kann oxydiert werden.

Künstliche wie natürliche Mischungen aus einem schnell und einem langsam oxydierbaren Blutfarbstoff lieferten bei der Oxydation abgeknickte Kurven, die sich als Summation zweier mit verschiedener Geschwindigkeit ablaufender pseudomonomolekularer Reaktionen interpretieren ließen.

Die Oxydation von COHb war im großen und ganzen der von O_2Hb analog. Es waren erheblich höhere $K_3Fe(CN)_6$-Mengen erforderlich, um eine für die Messungen ausreichend rasche Reaktion zu erhalten. Mischungen von einem schnell und einem langsam oxydierbaren COHb ergaben im Gegensatz zu dem Verhalten von O_2Hb keine Summationskurven.

Literatur

[1] Austin, J. H., and D. L. Drabkin: J. of Biol. Chem. **112**, 67 (1935—36). — [2] Betke, K.: Naturwissenschaften **39**, 481 (1952). — [3] Betke, K.: Klin. Wschr. **1953**, 573. — [4] Betke, K.: Der menschliche rote Blutfarbstoff, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — [5] Betke, K.: Symposion über Struktur und Funktion der Erythrocyten. Berlin 1955. — [6] Betke, K., u. I. Greinacher: Klin. Wschr. **1955**, 611. — [7] Betke, K., u. W. Savelsberg: Biochem. Z. **320**, 431 (1950). — [8] Conant, J. B.: J. of Biol. Chem. **57**, 401 (1923). — [9] Druckrey, H., P. Danneberg, K. Kaiser, J. Fromme u. H. Schneider: Biochem. Z. **322**, 535 (1952). — [10] Haldane, M.: J. of Physiol. **22**, 298 (1897—1898). — [11] Hartridge, H., and F. J. W. Roughton: Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. *A*. **104**, 395 (1923). — [12] Hartridge, H., and F. J. W. Roughton: Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. *A*, **107**, 654 (1925). — [13] Havemann, R.: Biochem. Z. **314**, 118 (1943). — [14] Havemann, R., u. W. Heubner: Biochem. Z. **299**, 222 (1938). — [15] Havemann, R., F. Jung u. B. von Issekutz: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [16] Havemann, R., u. K. Wolff: Biochem. Z. **293**, 399 (1937). — [17] Hecker, F.: Inaugural-Dissertation, Freiburg 1955. — [18] Kubowitz, F.: Persönl. Mitteilung 1955. — [19] Laszt, L.: Helvet. physiol. Acta **3**, 291 (1945). — [20] Roughton, F. J. W., J. W. Legge and P. Nicolson: Haemoglobin-Symposium. London: Butterworths Sci. Publ. 1949. — [21] Schüler, H.: Biochem. Z. **255**, 474 (1932). — [22] Zeynek von, R.: Arch. f. Physiol. **1899**, 460.

Doz. Dr. K. Betke, Freiburg/Br., Univ.-Kinderklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 220—232 (1956)

Aus der Universitäts-Kinderklinik Freiburg im Breisgau
(Direktor: Prof. Dr. W. KELLER)

Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Natriumnitrit*

Von
K. BETKE, I. GREINACHER und O. TIETZE

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. April 1956)

Die Oxydation von Blutfarbstoff mittels Natriumnitrit ($NaNO_2$) zu Hämiglobin (Methämoglobin, Hb^{III}) ist vielfach experimentell untersucht worden. Nitrit ist — im Gegensatz etwa zu Kaliumferricyanid — in der Lage, auch den in intakten roten Zellen eingeschlossenen Blutfarbstoff zu oxydieren, wobei als besonderer Vorteil hinzukommt, daß bei diesem Vorgang die Zellen nicht nennenswert geschädigt werden. Außerdem haben die besonderen Eigenarten des Reaktionsablaufs bei der Nitritoxydation, die einer autokatalytischen Reaktion entsprechen[1,2], mehrfach das Interesse von Untersuchern geweckt. 1950 stellte SPICER fest, daß zwischen verschiedenen Tierarten Differenzen in bezug auf die Oxydierbarkeit des Blutfarbstoffs innerhalb und außerhalb der roten Zellen bestehen. Durch eigene Untersuchungen wurde gefunden, daß menschlicher Nabelschnur-Blutfarbstoff durch $NaNO_2$ etwa doppelt so schnell oxydierbar ist wie Erwachsenen-Blutfarbstoff[2, 3]. In der Zwischenzeit haben wir noch Blutfarbstoff verschiedener Tiere untersucht und können auch einige neue Befunde in bezug auf die Eigenart des Reaktionsablaufs der Nitritoxydation mitteilen.

Material und Methodik

In der Methodik lehnten wir uns eng an das Vorgehen bei der Oxydation mit Kaliumferricyanid an, über die in der vorhergehenden Mitteilung berichtet wurde[4]. Wir können uns daher mit kurzen Hinweisen begnügen.

Natriumnitrit. Für die Versuche benutzten wir 0,025—0,1 mol Lösungen, die jeweils frisch aus einer 0,25 mol Stammlösung bereitet wurden. Die Stammlösung enthielt 0,25 % Natriumcarbonat und wurde alle 10 Tage erneuert.

Versuchsvorgang. Die Blutfarbstofflösung (2,5 cm^3) wurde in der Photometercuvette des Zeiss-Spektralphotometers mit einem geringen Volumen der Nitritlösung (0,05—0,1 cm^3) versetzt. Nach raschem Durchmischen wurde die Bildung von Hb^{III} im Ablauf der Zeit am Anwachsen der Extinktion bei 630 mμ verfolgt.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Im *Reaktionsansatz* befanden sich in der meist gewählten Anordnung $5{,}76 \cdot 10^{-5}$ Äqu./l O_2Hb (1 Äquivalent = $^1/_1$ Molekül, Äquivalentgewicht = 17000). Natriumnitrit war in einer Konzentration von $9{,}8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l vorhanden. Auf 1 Äquivalent O_2Hb entfielen also meist 17 Moleküle $NaNO_2$.

Alle Versuche wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Für 10 ohne Auswahl herausgegriffene Doppelbestimmungen mit einer Halbwertzeit zwischen 1 und 2 min errechnete sich eine Streuung gegenüber dem Mittelwert von $\pm$ 4,9 sec bei einem mittleren Fehler von $\pm$ 1,55 sec. Berechnet auf eine durchschnittliche Halbwertzeit von $1^1/_2$ min ergibt das eine mittlere Streuung der Einzelbestimmung von rund $\pm$ 5 %.

Titration von O_2Hb mit Natriumnitrit. Außer der Verfolgung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei Blutfarbstoff vom Menschen und von einigen Tieren eine Titration durchgeführt. Hierzu wurden gepufferte O_2Hb-Lösungen mit steigenden Mengen $NaNO_2$ versetzt und bis zu 8 Std bei 37° C zum Teil auch bei 40° C inkubiert. Anschließend wurde der Gehalt an Hb^{III} in den einzelnen Proben nach Havemann, Jung u. v. Issekutz (Auslöschung der Hb^{III}-Bande bei 630 mμ nach Zusatz von KCN) bestimmt. Von den erhaltenen Werten wurde der Betrag an Hb^{III} abgezogen, der sich in einer nicht mit $NaNO_2$ versetzten Probe unter den gleichen Bedingungen spontan gebildet hatte.

Untersuchungsgut. Die Ergebnisse der Arbeit gründen sich auf die Untersuchung der Blutproben von 44 Erwachsenen, 13 Neugeborenen (Nabelschnurblut*), 4 erwachsenen Rindern, 3 Rinderfeten (bei Schlachtung der Muttertiere gewonnen), 2 Hirschen**, 3 Schweinen, 3 Hammeln, 2 Kaninchen, 4 Meerschweinchen und 10 Mäusen. Außerdem wurden noch 3 Blutproben von Sichelzellanämie-Patienten und 1 Probe eines heterozygoten Trägers der Hämoglobinanomalie C (Hb A und Hb C im Blut) untersucht. Diese pathologischen menschlichen Blutproben wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. K. Singer, Chicago, zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse

1. Auswertung der Versuchsergebnisse

Nach Zusatz von $NaNO_2$ bildete sich im Hämolysat Hb^{III} in dem für diese Reaktion bekannten charakteristischen S-förmigen Ablauf[1, 12]. Die Hb^{III}-Bildung setzt langsam und unmerklich ein, steigert sich weiterhin zunehmend und klingt schließlich wieder aus (Abb. 1). Eine Reaktionskonstante für diese Form des Ablaufs zu ermitteln, wäre umständlich, insbesondere weil die Kurven keineswegs immer symmetrisch sind. Für die Bezeichnung der Reaktionsgeschwindigkeit haben wir, dem allgemeinen Brauch folgend, die Angabe der Halbwertzeit (d. h. Zeit, die bis zur Umsetzung der Hälfte des Blutfarbstoffs verstreicht) gewählt.

2. Einfluß äußerer Versuchsbedingungen

a) Vorbereitung der O_2Hb-Lösungen. Im Gegensatz zur Oxydation mit Kaliumferricyanid zeigte die mit $NaNO_2$ eine Abhängigkeit vom Ausmaß der Reinigung des Hämolysats. Einfache Hämolysate gewaschener

* Herrn Prof. Dr. Elert, kommissarischem Direktor der Univ.-Frauenklinik Freiburg/Br., danken wir für die Überlassung des Nabelschnurblutes.

** Für die Überlassung der Hirsch-Blutproben danken wir Herrn Dr. E. Undritz, Basel.

Erythrocyten oxydierten sich langsamer als Hämolysate, die durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd oder durch Adsorption + Dialyse gereinigt worden waren (Abb. 1). Die Reaktionsgeschwindigkeit bei den beiden letzten Präparationsarten war auch nicht immer identisch; sie war bei einzelnen lediglich adsorbierten Proben ein wenig geringer als bei den zusätzlich dialysierten. — Bei unseren vergleichenden Unter-

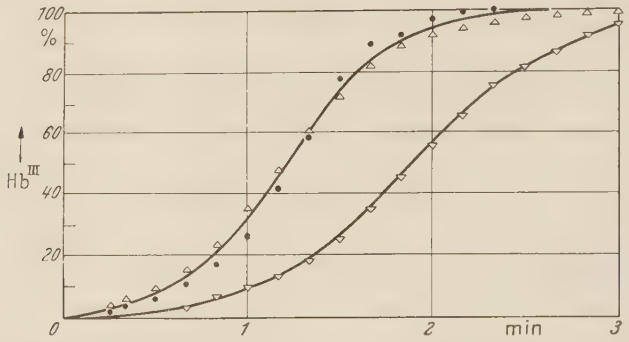


Abb. 1. Oxydation von O_2Hb des erwachsenen Menschen durch Natriumnitrit. pH 6,8. — ▽ einfaches Hämolysat gewaschener Erythrocyten. △ durch Adsorption gereinigtes Hämolysat. • durch Adsorption und Dialyse gereinigtes Hämolysat

suchungen haben wir fast nur mit Präparationen gearbeitet, die durch Adsorption gereinigt waren.

Wurde den O_2Hb-Lösungen vor Versuchsbeginn eine äquivalente Menge Jod zugesetzt, so änderte das die Reaktionsgeschwindigkeit nicht. Dagegen verzögerte ein minimaler Zusatz von Ascorbinsäure die Reaktion beträchtlich. Vgl. unten S. 224.

b) Pufferung. Mit fallendem p_H stieg die Reaktionsgeschwindigkeit außerordentlich (siehe Tab. 1), stärker als es bei der Oxydation mit $K_3Fe(CN)_6$ der Fall war. Die in der Tabelle angegebenen p_H-Werte wurden in den fertigen O_2Hb-Lösungen mit der Glaselektrode ermittelt. Die von uns gefundene Abhängigkeit der Oxydationsgeschwindigkeit vom p_H stimmt mit den von Remmer mitgeteilten Werten gut überein.

Tabelle 1. *Geschwindigkeit der Oxydation von Erwachsenen-O_2Hb durch $NaNO_2$ bei verschiedenem p_H (Phosphat 0,1 mol.)*

pH	6,1	6,58	6,88
Halbwertzeit sec	19	182	610
Reaktionsgeschwindigkeit relativ, abgerundet . . .	30	3,5	1
Relative Reaktionsgeschwindigkeiten bei $K_3Fe(CN)_6$-Oxydation. .	4	2	1

Die Pufferkonzentration hatte ebenfalls einen Einfluß. Erhöhung der Phosphatkonzentration von 0,1 mol auf 0,4 mol, also auf das 4fache, ließ die Oxydation mit der doppelten Geschwindigkeit ablaufen.

c) Temperatur. Orientierende Messungen mit vorgekühlten und vorgewärmten Lösungen zeigten, daß mit steigender Temperatur die Oxydationsgeschwindigkeit zunimmt. Alle in dieser Mitteilung referierten Versuche wurden wie die der vorhergehenden Mitteilung[4] bei Zimmertemperatur vorgenommen.

d) Konzentration an $NaNO_2$. Mit steigender Konzentration an $NaNO_2$ stieg die Reaktionsgeschwindigkeit mehr als proportional (siehe Tab. 2). Auch diese Befunde stimmen mit denen von Remmer überein.

Tabelle 2. *Geschwindigkeit der Oxydation von Erwachsenen-O_2Hb bei verschiedenen Konzentrationen an $NaNO_2$*

$NaNO_2$ Mol/l	$4{,}3 \cdot 10^{-4}$	$7{,}15 \cdot 10^{-4}$	$10{,}5 \cdot 10^{-4}$	$14{,}3 \cdot 10^{-4}$
Halbwertzeit sec . . .	310	120	77	53
NaO_2-Konzentr. relativ	1,0	1,66	2,33	3,33
Reaktionsgeschwindigkeit relativ	1,0	2,58	4,03	5,85

Bei der nachträglichen Auswertung der in mehreren Monaten entstandenen Versuchsprotokolle fiel auf, daß einzelne Versuchsserien in ihren Reaktionsgeschwindigkeiten systematisch von anderen abwichen. Die Unstimmigkeiten waren jeweils auf die Benutzungsdauer einer Stammlösung von $NaNO_2$ beschränkt. Wir können nachträglich nicht ausschließen, daß es sich vielleicht um die Auswirkung von Wägefehlern handelt; möglicherweise unterschieden sich die verschiedenen Stammlösungen aber auch in irgendeiner anderen, uns vorläufig nicht erklärbaren Hinsicht.

e) Konzentration an Blutfarbstoff. Eine Veränderung der Blutfarbstoffkonzentration hatte nur einen mäßig starken Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit: mit steigender Menge an Blutfarbstoff sank sie. Bei der 4fachen Menge an O_2Hb verlängerte sich die Halbwertzeit auf nicht ganz das $1\frac{1}{2}$fache (siehe Abb. 2).

f) Gehalt an Hämiglobin vor Versuchsbeginn. Eine aus mit $NaNO_2$ behandelten Erythrocyten hergestellte gereinigte, dialysierte Hb^{III}-Lösung wurde in verschiedenen Anteilen zu O_2Hb-Lösungen gesetzt, wobei die Gesamtblutfarbstoff-Konzentration in allen Ansätzen gleich war. Die dann durchgeführte Oxydation mit $NaNO_2$ lief um so schneller ab, je mehr Hb^{III} in den Lösungen vorhanden war. Die Beschleunigung ging über den Effekt hinaus, der allein aus der Tatsache zu erwarten war, daß die Konzentration an O_2Hb in den Proben mit viel Hb^{III} geringer war als in denen mit wenig Hb^{III} (Abb. 2). Die typische S-Form der Kurven veränderte sich — wie bereits Jung u. Remmer feststellten — durch den Hb^{III}-Zusatz nicht.

Die S-Form der Kurven blieb auch erhalten, wenn zuerst $^1/_5$ der Nitritmenge und nach 1, 3 oder 5 min der Rest zugesetzt wurde, d. h. also, wenn die Hauptmenge des Nitrit in die bereits anlaufende Reaktion kam (Abb. 3). Die Halbwertzeiten für die dann einsetzende rasche Restumsetzung verkürzte sich ein wenig, und zwar umso mehr, je später der Zusatz der Hauptmenge erfolgte.

Merkwürdigerweise trat eine solche Verkürzung der Halbwertzeit der Restreaktion nicht ein, wenn man den Oxydationsprozeß mit einer geringen Menge Kaliumferricyanid anlaufen ließ und dann Natriumnitrit zusetzte. Gegenüber der Oxydation ohne vorherige Gabe von Kaliumferricyanid waren die Halbwertzeiten eher verlängert.

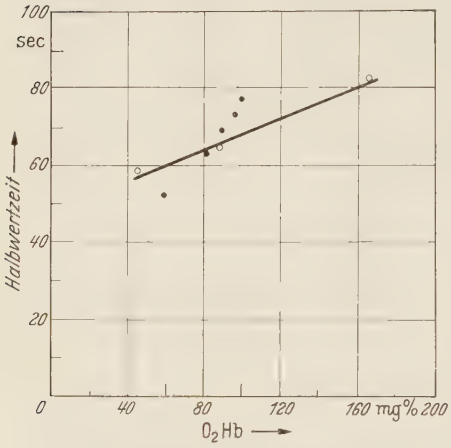


Abb. 2. Abhängigkeit der Halbwertzeit von der Blutfarbstoffkonzentration und vom HbIII-Gehalt. ○ O_2Hb-Lösungen verschiedener Blutfarbstoffkonzentration. • Blutfarbstofflösungen gleicher Gesamtkonzentration, aber mit verschieden starker Beimischung von HbIII. Eingetragen ist die effektive O_2Hb-Konzentration

g) Zusatz von Ascorbinsäure. Wurde dem Hämolysat Ascorbinsäure zugesetzt und 1 min später das Nitrit, dann lief die Oxydation verlangsamt ab (Abb. 4). Bei einer Dosierung von 1 Molekül Ascorbinsäure auf 10 Äquivalente O_2Hb und 170 Molekülen $NaNO_2$ resultierte eine Verlängerung der Halbwertzeit auf das 4fache. Wurde die Menge Ascorbinsäure auf 3 oder 4 Moleküle pro 10 Äquivalente O_2Hb erhöht, dann lief die Reaktion nur noch gerade eben an, obwohl der Überschuß an $NaNO_2$ immer noch ganz erheblich war. Die Verzögerungswirkung der Ascorbinsäure lag in einer Verlängerung der Anlaufzeit (Abb. 4); einmal in Gang gekommen, konnte die Oxydation mit relativ hoher Geschwindigkeit zu Ende laufen.

Ascorbinsäure hemmte ebenfalls, wenn sie vor Auslösung der Oxydation der $NaNO_2$-Lösung zugesetzt wurde. Das Ausmaß der Hemmung war ein wenig geringer, wahrscheinlich weil durch die Alkalisierung der $NaNO_2$-Lösung durch Na_2CO_3 die Ascorbinsäure teilweise unwirksam wurde.

Wurde Ascorbinsäure zu einer bereits angelaufenen Oxydation gegeben, resultierte nur eine geringe Hemmung. Es wurde vom Zeitpunkt des Zusatzes an die weitere Eigenbeschleunigung der Reaktion aufgehoben (Abb. 5).

Als Ascorbinsäure wurde der Ampulleninhalt von „Redoxon forte“ (Roche) verwendet. Die Verdünnungen mußten mit Wasser hergestellt werden, das in einer Glasapparatur destilliert worden war. Das übliche im Laboratorium verwendete destillierte Wasser aus einer Großanlage inaktivierte die Ascorbinsäure bei der erforderlichen starken Verdünnung rasch.

3. *Vergleichende Untersuchungen*

a) Vergleich verschiedener Individuen einer Species. Abb. 6 zeigt den Streubereich der Oxydation von O_2Hb bei 4 verschiedenen Erwachsenen und bei 4 Mäusen. Wenn auch die Übereinstimmung der Werte nicht

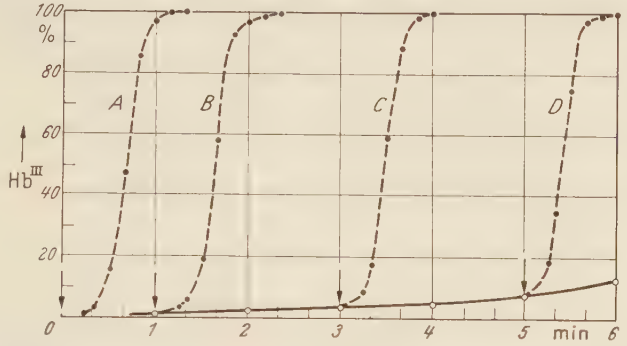


Abb. 3. Wirkung der Vorgabe von einer geringen Menge Nitrit. Kurve *A* übliche Auslösung mit 0,1 cm³ 0,025 mol. $NaNO_2$. Kurve *B*, *C*, *D* Vorgabe von 0,02 cm³ 0,025 mol. $NaNO_2$ zum Zeitpunkt 0; Auslösung der Restreaktion mit 0,08 cm³ 0,025 mol. $NaNO_2$ bei 1, 3 und 5 min

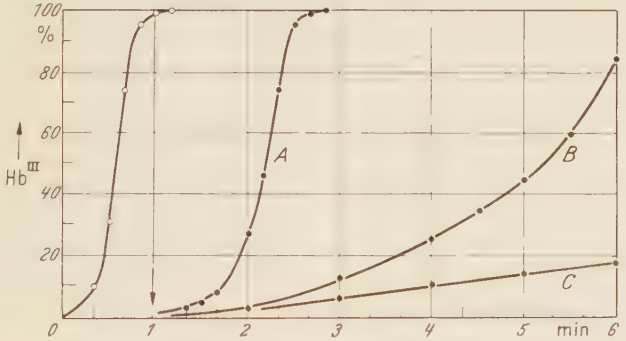


Abb. 4. Wirkung des Zusatzes von Ascorbinsäure. Links Kontrollreaktion. Kurven *A*, *B* u. *C*: Im Zeitpunkt 0 Ascorbinsäurezusatz zum Hämolysat, nach 1 min (Pfeil) Nitritzusatz. Äqu. O_2Hb: Mol$NaNO_2$ = 1:17 für alle Kurven. Pro Äqu. O_2Hb kommen an Mol Ascorbinsäure bei Kurve *A* 0,058, bei Kurve *B* 0,193, bei Kurve *C* 0,387

ganz so scharf war wie bei der Kaliumferricyanidoxydation, so sahen wir doch selten größere individuelle Abweichungen der Halbwertzeit als $\pm$ 10% vom Mittelwert.

Kinder über dem Alter von ½ Jahr verhielten sich wie Erwachsene.

b) Vergleich verschiedener Species. Wegen der außerordentlich hohen Empfindlichkeit der $NaNO_2$-Oxydation gegenüber den äußeren Versuchsbedingungen konnte ein Vergleich immer nur in bezug auf einen Standardblutfarbstoff vorgenommen werden. Als solcher wurde Erwachsenenblutfarbstoff gewählt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden dann

einfach als relative Zahlen gegenüber der Reaktionsgeschwindigkeit von Erwachsenenblutfarbstoff = 1 angegeben.

Wie bei der Kaliumferricyanidoxydation so bestanden auch bei der Nitritoxydation zwischen den einzelnen Species erhebliche Differenzen.

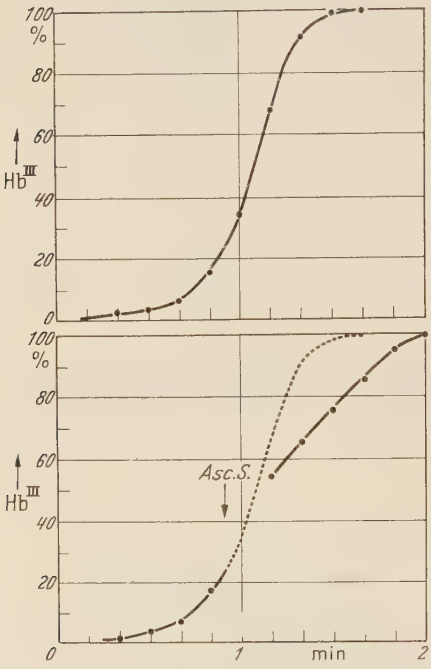


Abb. 5. Zusatz von Ascorbinsäure während der Nitritoxydation. Oben: Kontrollkurve. Unten: Nach 55 sec Zusatz von Ascorbinsäure (0,115 Mol./Äqu. O_2Hb). Nitritkonzentration = 17 Mol./Äqu. O_2Hb. Punktiert: mutmaßlicher Ablauf ohne Ascorbinsäurezusatz

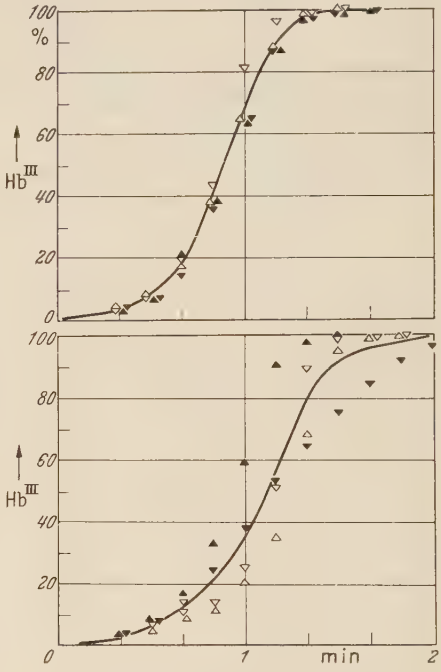


Abb. 6. Oxydation von 4 verschiedenen Blutfarbstoffproben erwachsener Menschen (oben) und weißer Mäuse (unten). Nitritkonzentration unten 4mal so hoch wie oben

Als Beispiel diene Abb. 7. Überraschenderweise stellten sich die verschiedenen Oxydationsgeschwindigkeiten jedoch ganz anders dar als bei der Kaliumferricyanidoxydation. Tab. 3 stellt die gefundenen Werte denen bei der $K_3Fe(CN)_6$-Oxydation gegenüber.

Tabelle 3. *Oxydationsgeschwindigkeiten gereinigter Oxyhämoglobine. Relative Zahlen. Mensch = 1*

	Mensch erwachs.	Mensch neugeb.	Hammel	Rind	Rind Fetus	Schwein	Kaninchen	Meerschwein.	Maus
Oxydation mit $K_3Fe(CN)_6$. .	1	1,5	2,5	3	1,5	2,5	3	3	3
Oxydation mit $NaNO_2$ . . .	1	2,5	(1,5)	1,5	2,5	0,5	1	0,75	0,1

Die Blutfarbstoffe der beiden erwähnten asiatischen Hirsche (Davidhirsch und Sikhahirsch) zeigten eine relative Oxydationsgeschwindigkeit von fast 0,5. Sichelzell-Hb des Menschen verhielt sich wie normales Erwachsenen-Hb, ebenso die anomale Hb-Mischung AC. — Der Wert für den Blutfarbstoff des Hammels wurde in Klammern gesetzt, weil die Differenz gegenüber menschlichem O_2Hb nicht eindeutig war.

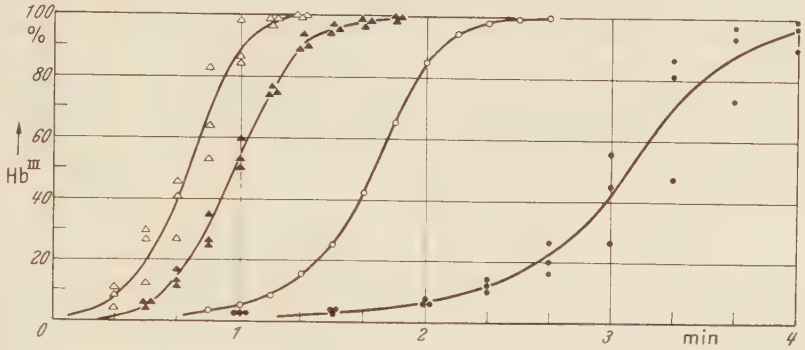


Abb. 7. Oxydation der Blutfarbstoffproben von je 3 Rinderfeten (△), erwachsenen Rindern (▲), Schweinen (•) im Vergleich mit menschlichem Blutfarbstoff (○)

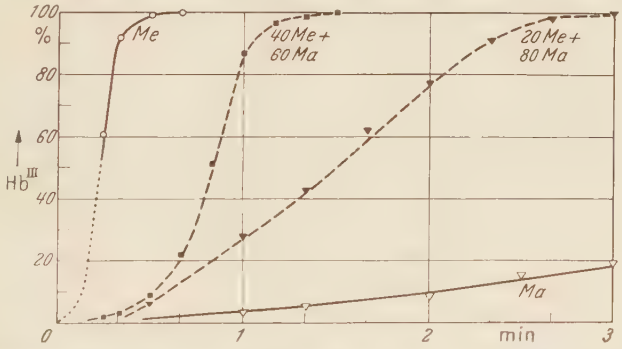


Abb. 8. Oxydation von O_2Hb des Menschen (*Me*) und der weißen Maus (*Ma*) und von Mischungen beider Blutfarbstoffe. Mischungsverhältnis an den Kurven angegeben

Von allen untersuchten Blutfarbstoffen war der der weißen Maus am interessantesten. Während er bei der $K_3Fe(CN)_6$-Oxydation 3mal so rasch reagierte wie menschlicher[1], war er gegenüber der Nitritoxydation erstaunlich unempfindlich. Die Halbwertzeit betrug bei gleicher Nitritkonzentration gegenüber menschlichem O_2Hb das 10fache. Bei 4facher Nitritkonzentration waren die Halbwertzeiten etwa gleich (Abb. 6).

c) Oxydation von Blutfarbstoffmischungen. Bei der Oxydation von Mischungen von Mäuse- und Menschen-O_2Hb resultierten Kurven, die formal nicht von Oxydationskurven einheitlicher Blutfarbstoffe abwichen. Es entstanden die gleichen S-förmigen Abläufe (Abb. 8). Die

Oxydationsgeschwindigkeit des Gemisches war höher als bei einer einfachen Summation der jeweiligen Oxydationsgeschwindigkeiten der Komponenten, wie sich aus Abb. 8 ohne weiteres ergibt. Die träge Reaktion des Mäuseblutfarbstoffs ließ sich also durch Zusatz des rasch reagierenden Menschenblutfarbstoffs beschleunigen.

Die natürlichen Blutfarbstoffmischungen der menschlichen Neugeborenen und der Rinderfeten (fetales + bleibendes Hb) lieferten ebenfalls einheitliche S-förmige Abläufe der Oxydation. Aus ihnen kann die wahre Reaktionsgeschwindigkeit des jeweiligen fetalen Hb nicht abgeleitet werden. Es läßt sich nur sagen, daß sie höher sein muß als der in der Tabelle für das Nabelschnur- bzw. Fetalblut aufgeführte Wert, weil die Oxydationsgeschwindigkeit des darin enthaltenen bleibenden Farbstoffs niederer ist.

4. Titration der Blutfarbstoffe mit $NaNO_2$

Die Titrationsversuche (Inkubation von Hämolysat mit steigenden Mengen Nitrit und Messung der bei vollständiger Reaktion gebildeten Mengen Hb^{III}) wurden an O_2Hb des neugeborenen Menschen (10 Nabelschnurblutproben), des Kaninchens (2 Tiere) und der Maus (4 Tiere) durchgeführt, jeweils vergleichend mit O_2Hb des erwachsenen Menschen. Im Gegensatz zu dem differenten Verhalten in bezug auf die Oxydationsgeschwindigkeit fanden sich keine Differenzen in bezug auf die quantitative Umsetzung.

Das Verhältnis von neugebildetem Hb^{III} (abzüglich der Spontanoxydation) zu der zugesetzten Menge Nitrit war in allen Versuchen durchschnittlich knapp 1 Äquivalent Hb^{III} auf 1 Molekül $NaNO_2$. Wenn sehr kleine Menge Nitrit genommen wurden (1/10 der Hb-Äquivalente), rückte das Verhältnis $NaNO_2$: Hb^{III} auf nahezu 1 : 2. — Störend war bei den erforderlichen langen Wartezeiten die hohe Spontanoxydation der von uns verwendeten gereinigten Hämolysate.

Besprechung

Bei der Oxydation von O_2Hb durch Natriumnitrit wird gleichzeitig mit der Oxydation des Hb-Eisens auch Nitrit zu Nitrat oxydiert[15]. Die Verhältnisse sind also andere als im Fall der Oxydation mit Kaliumferricyanid, die einen einfachen Oxydationsprozeß darstellt, bei dem das Oxydans reduziert wird. Diese grundlegende Verschiedenheit macht sich auch im formalen Ablauf bemerkbar: Ein Exponentialprozeß bei der $K_3Fe(CN)_6$-Oxydation, ein „autokatalytischer“[12] oder „Ketten“[16]-Prozeß bei der $NaNO_2$-Oxydation.

Welche Vorgänge sich im einzelnen bei der Nitritoxydation abspielen, ist nicht bekannt. Man kann vermuten, daß der Blutfarbstoff beschleunigend auf einen auch ohne ihn in einer Nitritlösung stattfindenden Dismutationsprozeß wirkt, in dessen Ablauf Nitrit unter Sauerstoffaufnahme zu Nitrat oxydiert wird[9]. Der Blutfarbstoff stellt dabei nicht einen

einfachen Katalysator dar, sondern geht unter Umwandlung in Hämiglobin quantitativ mit in die Reaktion ein. Die derzeit angenommene Summenformel für den Vorgang lautet[8, 12]:

$$NaNO_2 + 2\ O_2Hb + H_2O \rightarrow NaNO_3 + 2\ HbOH + O_2 \qquad (1)$$

Der Einfluß von p_H und Nitritkonzentration stellte sich in den eigenen Versuchen in gleicher Weise dar wie bei den Untersuchungen von Remmer und Jung u. Remmer. Aus den Abhängigkeiten hatten diese Autoren geschlossen, daß möglicherweise die undissoziierte HNO_2 der Reaktionspartner des Blutfarbstoffs ist; ihre Konzentration sei in dem untersuchten Gebiet in gleicher Weise von der H-Ionen- wie von der Nitritkonzentration abhängig. Auch der von den genannten Autoren bereits angegebene verhältnismäßig geringe Einfluß einer Veränderung der O_2Hb-Konzentration wurde bestätigt, wobei bemerkenswert ist, daß eine Erhöhung der O_2Hb-Konzentration die Reaktion verlangsamte. O_2Hb kann daher kaum selbst das aktive Prinzip in der „Autokatalyse" darstellen, obwohl es bei dem gewählten p_H überhaupt erst das Anlaufen des Prozesses ermöglicht. Auch Hämiglobin kommt als eigentlicher Katalysator nicht in Frage, denn obwohl es einen deutlich beschleunigenden Einfluß auf den Reaktionsablauf hatte (Abb. 2), blieb doch immer eine Anlaufstrecke bei der Reaktion erhalten. Nicht einmal ein Anlaufenlassen der Reaktion mit einer kleinen Menge Nitrit (die aber immer noch einen Überschuß gegenüber dem Blutfarbstoff darstellte) konnte in der Restreaktion nach Zusatz der Hauptmenge den Anlauf zum Verschwinden bringen (Abb. 3).

Konnte damit zu der Natur des beschleunigenden Prinzips der Reaktion kein neuer Aufschluß erhalten werden, so wurde auf der anderen Seite aber ein erstaunlich wirksamer Hemmstoff gefunden, die Ascorbinsäure (Abb. 4 u. 5). Quantitativ war in den Ansätzen die Menge an Ascorbinsäure zu gering, um etwa einen wirksamen Schutz des Hb-Eisens vor einer Oxydation darzustellen. Bei der Kaliumferricyanidoxydation hatte im übrigen die gleiche Dosierung von Ascorbinsäure keinen erkennbaren Effekt gemacht[4]. Die Tatsache, daß besonders das Anlaufen der Reaktion verzögert wurde, deutet darauf hin, daß die Ascorbinsäure mit dem eigentlichen Katalysator der Reaktion interferiert bzw. seine Bildung hintanhält. Vielleicht gibt diese Beobachtung einen neuen Ansatzpunkt zur Aufklärung der Nitritoxydation. — Die Wirkung der Ascorbinsäure macht die Abhängigkeit der Oxydationsgeschwindigkeit vom Ausmaß der Reinigung der Hämolysate erklärlich. Insbesondere leuchtet ein, daß einfache Hämolysate langsamer oxydiert wurden, da sie Stromareste mit reduzierenden Substanzen enthalten.

Die Blutfarbstoffe des neugeborenen und des erwachsenen Menschen und verschiedener Tiere zeigten reproduzierbar eine differente Oxydierbarkeit mit Nitrit. Nachdem wir in älteren Untersuchungen beim

Vergleich der Nitritoxydation von Neugeborenen- und Erwachsenenblutfarbstoff eine ähnliche Differenz bekommen hatten, wie bei der Kaliumferricyanidoxydation[2, 3] (Nabelschnur O_2Hb wurde rund doppelt so schnell oxydiert wie Erwachsenen-O_2Hb), überraschte uns die Tatsache, daß eine derartige Parallelität des Verhaltens gegenüber den beiden Oxydationsarten keineswegs eine allgemeine Gesetzmäßigkeit war. Hatte beispielsweise bei der Kaliumferricyanidoxydation der Blutfarbstoff des Rinderfetus eine Mittelstellung zwischen dem des erwachsenen Rindes und dem des Menschen eingenommen, so war bei der Nitritoxydation die Reihenfolge eine andere: Mensch — Rind — Rinderfetus. Besonders auffallend war aber die außerordentlich langsame Oxydation des Mäuseblutfarbstoffes, der bei der Kaliumferricyanidoxydation sehr rasch reagierte.

Diese Befunde und weitere mit anderen Oxydationsmitteln erhobene[5] zeigen, daß man *nicht von einer Oxydationsempfindlichkeit eines Blutfarbstoffes schlechthin* sprechen kann. Es kommt immer auch auf das Oxydans an. Im Einzelfall kann ein Blutfarbstoff, der gegen das eine Oxydans sehr empfindlich ist, gegen ein anderes relativ resistent sein.

Wodurch die unterschiedliche Oxydierbarkeit der verschiedenen Oxyhämoglobine mit Nitrit bedingt ist, läßt sich nicht sagen, weil der Mechanismus der Nitritoxydation selbst ungeklärt ist. Bei der Kaliumferricyanidoxydation konnten Argumente dafür beigebracht werden, daß die Differenzen bei den einzelnen Species Unterschiede in der Geschwindigkeit der Sauerstoffdissoziation widerspiegelten[4]. Auch bei der Nitritoxydation ist die Sauerstoffdissoziation von Bedeutung, weil ein Teil des molekular an den Blutfarbstoff gebundenen Sauerstoffs erforderlich ist, damit der Oxydationsprozeß überhaupt in der oben in Formel (1) angegebenen Weise ablaufen kann. Die Oxydation von sauerstofffreiem Hb mit Nitrit geht nach einer anderen Gesetzmäßigkeit vor sich als die von O_2Hb; sie läuft viel langsamer ab[3] und führt zu den Endprodukten Hb^{III} und NO-Hb[6, 12, 15]. Noch wesentlich langsamer ist die Reaktion von CO-Hb mit Nitrit[5]. Daraus kann man zwar ableiten, welch erhebliche Rolle es spielt, daß O_2 für die Reaktion zur Verfügung steht. Für die Oxydationsgeschwindigkeit des O_2Hb ist aber in erster Linie die Steilheit des Anlaufs, des ersten Teils der S-Kurve, entscheidend. Die dabei gefundenen Reaktionszeiten liegen weit oberhalb von denen, die man für die O_2-Dissoziation voraussetzen kann. Damit ist es unwahrscheinlich, daß die O_2-Dissoziation in einer Weise wie bei der $K_3Fe(NC)_6$-Oxydation als limitierender Faktor in Betracht kommt.

Bei einer Mischung von einem langsam und einem schnell reagierenden Blutfarbstoff (O_2Hb der Maus und des Menschen) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der langsamer reagierenden Komponente beschleunigt (Abb. 8). Die Oxydation war schneller zu Ende als bei einfacher Summierung der Reaktionsgeschwindigkeiten zu erwarten gewesen wäre. Es

ergaben sich außerdem formal einheitliche Kurven. Daraus ist zu entnehmen, daß beide Komponenten nicht unabhängig voneinander reagieren (wie es bei der $K_3Fe(CN)_6$-Oxydation derartiger Mischungen der Fall ist[4]), sondern daß die Oxydation der einen Komponente die der anderen beeinflußt. Damit entfällt die Möglichkeit, rechnerisch die erhaltene Kurve in die der Einzelkomponenten zu zerlegen —, was bei der $K_3Fe(CN)_6$-Oxydation möglich war —, und es ist weiter nicht möglich, durch eine solche Zerlegung etwa die unbekannte Reaktionsgeschwindigkeit einer Komponente zu bestimmen (z. B. des fetalen Hb im Nabelschnur-Hb).

Durch die Titrationsversuche wurde ausgeschlossen, daß verschiedene Blutfarbstoffe einen verschiedenen $NaNO_2$-Verbrauch für die Bildung gleicher Mengen an Hb^{III} aufweisen, wie es beispielsweise bei der Oxydation durch Jod der Fall ist. Die Speciesunterschiede in den Oxydationsgeschwindigkeiten können also nicht auf quantitative Differenzen dieser Art zurückgeführt werden.

Auffallend ist, daß die erzielten Umsätze pro Molekül $NaNO_2$ nicht 2 Äquivalent Hb^{III} waren, wie es nach Formel (1) zu fordern war, sondern nur knapp 1 Äquivalent. Ein Fehler in der Einstellung der $NaNO_2$-Konzentration kann ausgeschlossen werden, da sie durch Titration mit Permanganat (Jander u. Jahr) überprüft worden war. Möglicherweise war unter den vorliegenden Bedingungen jedoch nicht alles Nitrit zur Reaktion gekommen. Die Spontanoxydation in den Kontrollansätzen schritt so schnell voran, daß nicht beliebig lange gewartet werden konnte. Nur wenn sehr wenig Nitrit in den Ansätzen war, erreichten wir einen Umsatz von 2 Äquivalent Hb^{III} auf 1 Molekül $NaNO_2$.

Die ermittelten Speciesdifferenzen der Oxydationsgeschwindigkeit gelten nur für Hämoglobin*lösungen*. In intakten Erythrocyten kann sich der Blutfarbstoff anders verhalten. Die Reaktion läuft formal nicht mehr in einer so ausgeprägten S-Form ab, sondern nähert sich nach einem angedeuteten Anlauf mehr einer Exponentialkurve[7]. Das Verhältnis der Oxydationsgeschwindigkeiten des Blutfarbstoffs in verschiedenen Erythrocytenarten kann anders sein als bei den zugehörigen Hämoglobinen[7, 18]. In vivo kommt noch als korrigierender Faktor der Rückbildungsmechanismus der Erythrocyten für Hb^{III} hinzu, der bei verschiedenen Species verschieden abläuft[13, 18]. Schließlich scheint in vivo auch die quantitative Beziehung nach Formel (1) nicht durchgehend zu stimmen[14].

Zusammenfassung

An Oxyhämoglobinlösungen von neugeborenen und erwachsenen Menschen und von verschiedenen Tieren wurde der zeitliche Ablauf der Oxydation nach Zusatz von Natriumnitrit untersucht. Die Oxydationsgeschwindigkeit hatte bei gleich gehaltenen äußeren Bedingungen für jede Blutfarbstoffart eine charakteristische Größe.

Die Oxydation beschleunigte sich stark mit fallendem p_H, steigender Nitritkonzentration und steigender Temperatur. Mit steigender

Blutfarbstoffkonzentration verlangsamte sich die Reaktion in geringem Maß. Vermehrter Gehalt an Hämiglobin (Methämoglobin) in der Blutfarbstofflösung wirkte gering beschleunigend.

Ascorbinsäure hemmte das Anlaufen der Oxydation bereits in geringen Konzentrationen; gleiche Mengen übten bei der Kaliumferricyanidoxydation keine erkennbare Wirkung aus.

Das Verhältnis der Oxydationsgeschwindigkeiten von Blutfarbstoffen verschiedener Tiere und des Menschen stellte sich bei der Nitritoxydation anders dar als bei der Ferricyanidoxydation. Besonders fiel das gegenüber Kaliumferricyanid sehr empfindliche O_2Hb der weißen Maus auf: Es wurde durch Nitrit 10mal langsamer oxydiert als das des Menschen.

Eine Mischung aus einem langsam und einem schnell reagierenden Blutfarbstoff (Mäuse- und Menschen-O_2Hb) lieferte bei der Oxydation einen einheitlichen Kurvenablauf mit mittlerer Geschwindigkeit; die Blutfarbstoffe beeinflussen sich also gegenseitig bei der Oxydation.

Literatur

[1] Austin, J. H., and D. L. Drabkin: J. of Biol. Chem. **112**, 67 (1935—36). — [2] Betke, K.: Naturwissenschaften **40**, 60 (1953). — [3] Betke, K.: Der menschliche rote Blutfarbstoff. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — [4] Betke, K., I. Greinacher u. F. Hecker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 207 (1956). — [5] Betke, K., u. Mitarb.: Unveröffentlichte Untersuchungen. — [6] Brooks, J.: Proc. Roy. Soc. (Lond.) Ser. B, **123**, 368 (1937). — [7] Godt, E.: Dissertation Freiburg 1956. — [8] Greenberg, L. A., D. Lester and H. W. Haggard: J. of Biol. Chem. **151**, 665 (1943). — [9] Havemann, R., u. W. Heubner: Biochem. Z. **299**, 222 (1938). — [10] Havemann, R., F. Jung u. B. v. Issekutz: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [11] Jander, G., u. K. F. Jahr: Maßanalyse, Sammlung Göschen Bd. 221. Berlin: W. de Gruyter 1948. — [12] Jung, F., u. H. Remmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 459 (1949). — [13] Kiese, M., u. W. Schwartzkopff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 267 (1947). — [14] Kiese, M., u. M. Soetbeer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 437 (1949). — [15] Meier, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **110**, 241 (1925). — [16] Rapoport, S.: Symposium über Struktur u. Funktion der roten Blutzellen. Berlin: Januar 1955. — [17] Remmer, H.: Inaug.-Dissertation. Berlin 1945. — [18] Spicer, S. S.: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **99**, 185 (1950).

Doz. Dr. K. Betke, Freiburg/Br., Univ.-Kinderklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 233—241 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
(Direktor: Professor Dr. Dr. A. W. Forst)

Die Wirkung von Adrenalin, Veratramin und Chinidin auf die Reizbildung im Herzen

Von
Melchior Reiter

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. März 1956)

Krayer hat 1949 gefunden, daß die positiv chronotrope Adrenalinwirkung durch Veratramin aufgehoben werden kann, ohne daß dabei die positiv inotrope Herzwirkung und die Blutdruckwirkung des Adrenalins beeinflußt werden. Damit ist gezeigt worden, daß die von den sogenannten adrenolytisch wirkenden Substanzen nicht erfaßte frequenzsteigernde Wirkung des Adrenalins grundsätzlich isoliert hemmbar ist. Auf Grund dieser spezifischen Wirkung scheint Veratramin besonders geeignet zu sein für das Studium der Reizbildung im Herzen und der ihr zugrunde liegenden Vorgänge, die noch kaum bekannt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einwirkung von Adrenalin, Veratramin und Chinidin auf die Schlagfrequenz der Herzen bzw. der Vorhöfe von Fröschen, Ratten und Meerschweinchen untersucht.

Methodik

1. Ganzes Froschherz. Die Froschherzen wurden nach Amsler präpariert, d. h. die Herzkammer wurde an der dem Aortenabgang gegenüberliegende Seite durch einen Schnitt senkrecht zur Hauptachse ziemlich weit geöffnet und ganz in Froschringer bei 20° C inkubiert. Die Herzspitze wurde über einer Glasfritte fixiert, und die zu einem isotonischen Hebel führende Verbindung wurde an der Aortenwurzel befestigt. Der Hebel war so eingerichtet, daß er mit einem Seitenarm bei jeder Herzkontraktion über einen Quecksilberkontakt einen Stromkreis schloß und dadurch den von Forst u. Heuwing beschriebenen Ordinatenschreiber steuerte. Auf diese Weise wurden die Hubhöhe des Ventrikels und seine Schlagfrequenz gleichzeitig registriert.

Die Suspensionslösung (Frosch-Ringer) hatte folgende Zusammensetzung (in mMol/l): NaCl 111; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $NaHCO_3$ 4,2; Glucose 5,6. Die Menge der verwendeten Lösung betrug 35 ml, sie wurde mit 5% CO_2 enthaltendem Sauerstoff durchströmt.

Nach Beginn der Inkubation nahm die Schlagfrequenz gewöhnlich ab, doch stellte sich nach etwa 30 min ein Niveau ein. Frequenzerhöhung wurde durch fortlaufende Adrenalininfusion in die Suspensionslösung erzielt. Adrenalin war in Frosch-Ringer gelöst; es wurden in der Minute 0,255 μg infundiert. Damit flossen dem

Suspensionsmedium in der Stunde 1,53 ml Lösung neu zu. Die so erreichte Frequenzsteigerung betrug beim Froschherzen im Durchschnitt 28 Schläge pro Minute, sie hielt sich trotz ständiger Infusion nicht völlig gleichmäßig über lange Zeit, die Frequenz nahm vielmehr in einer Stunde um 6% ab.

Die Froschversuche wurden in den Monaten März und April der Jahre 1954 und 1955 durchgeführt.

2. Vorhofpräparationen. Zur Messung der Schlagfrequenz isolierter Vorhöfe wurde ein leichter, kurzer Drahthebel verwendet, der fein gelagert ist und sich mittels einer Spiralfeder beliebig spannen läßt[1]. Seine Ausschläge bewegen sich

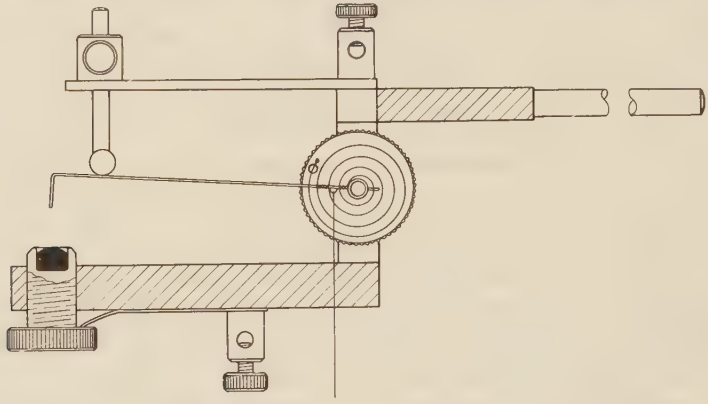


Abb. 1. Kontakthebel für die Messung der Schlagfrequenz isolierter Vorhöfe

zwischen dem Meniscus eines Quecksilbernapfes und einem einstellbaren Anschlag (Abb. 1). Zur Funkenlöschung ist dem Hg-Kontakt ein Kondensator parallel geschaltet. Bei Vorhöfen von Fröschen wurden die Frequenzen mit dem Ordinatenschreiber registriert. Die Messung der hohen Frequenzen der Vorhöfe von Meerschweinchen und Ratten erfolgte mit dem Impulszähler Nr. 650, Typ JCT der Firma Jaquet (Basel).

Die Warmblütervorhöfe wurden bei 37,5° C in der von Krebs u. Henseleit angegebenen Lösung (Volumen 35 ml) inkubiert. Als Substrat diente entweder Glucose (0,02 molar) allein oder zusammen mit Glutaminsäure (0,01 molar). Der Zusatz von Glutaminsäure hatte keinen statistisch verwertbaren Einfluß auf die Ausgangsfrequenz. Die Lösung wurde mit 5% CO_2-haltigem Sauerstoff durchströmt. Die Vorhöfe wurden an beiden Herzohren mit feinen Klemmen gefaßt und zwischen Glasfritte und Hebel aufgehängt. Adrenalininfusion erfolgte bei Berücksichtigung des entsprechenden Lösungsmittels hinsichtlich Geschwindigkeit und Konzentration wie unter 1.

Für die Herstellung der *Adrenalin*lösung wurde von der Suprarenin (Hydrochlorid)-Lösung 1:1000 (Farbwerke Hoechst AG) ausgegangen.

Das verwendete *Veratramin* (Präparat Nr. 3967 der Riker Lab., Inc.)[2] hatte folgende physikalische Daten: Optische Drehung $[\alpha]_D^{25}$ —69,5 in 95% Äthanol, Schmelzpunkt 207—209°, log E bei 270 mμ 2,66.

[1] Der Hebel wurde von dem Mechanikermeister des Instituts, Herrn Karl Heuwig, hergestellt; er kann von der Firma Braun-Melsungen bezogen werden.

[2] Für die Überlassung des Präparates danke ich Herrn Dr. J. W. Stutzman, Ricker Lab., Los Angeles, Cal.

Chinidin wurde in Form seines salzsauren Salzes ($C_{20}H_{24}O_2N_2 \cdot HCl \cdot H_2O$) verwendet.

Die Konzentrationen von Veratramin und Chinidin sind mit Ausnahme der Versuche der Abb. 3 und 4 auf die endlichen Konzentrationen berechnet und in Mol pro Liter Suspensionsmedium angegeben.

I. Wirkung von Adrenalin auf die Schlagfrequenz von Herzen verschiedener Tierarten

Wie beim isolierten Hundeherzen (Krayer, 1949), so läßt sich auch die Schlagfrequenz isolierter Herzen bzw. Vorhöfe von Fröschen,

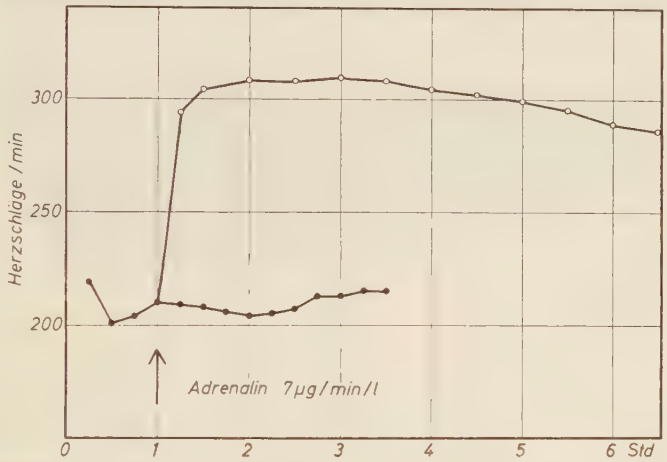


Abb. 2. Wirkung von Adrenalindauerinfusion (7 µg/min/l) auf die Schlagfrequenz isolierter Meerschweinchenvorhöfe. •—• Kontrollwerte; ○—○ bei Adrenalininfusion. Mittelwerte von je acht Vorhöfen. Abszisse: Zeit in Stunden

Meerschweinchen und Ratten durch fortlaufende Infusion von Adrenalin erhöhen und über mehrere Stunden auf einem annähernd gleichen Niveau halten. Der Verlauf der unbeeinflußten Frequenzkurve und der Kurve während der Adrenalininfusion bei Meerschweinchenvorhöfen ist in Abb. 2 widergegeben. Die einzelnen Werte stellen Mittelwerte von acht verschiedenen Vorhöfen dar.

Adrenalin (7 µg/min/l) bewirkt bei den einzelnen Tierarten eine verschieden starke Zunahme der Herzfrequenz. Und zwar besteht dabei nicht nur ein Unterschied zwischen Kalt- und Warmblütern, der möglicherweise durch die Temperaturunterschiede erklärt werden könnte (20° und 37,5 C). Wie aus der Zusammenstellung der Tab. 1 hervorgeht, beträgt die Frequenzzunahme bei einer Adrenalindauerinfusion von 7 µg/min/l und einer Temperatur von 37,5—38,7 C beim Hundeherzen 86, beim Meerschweinchenherz 96 und beim Rattenherz 160 Schläge in der Minute. Da die Ausgangsfrequenz beim Hund 146, beim Meerschweinchen 210 und bei der Ratte 260 pro Minute betrug, bedeutet dies,

Tabelle 1. *Wirkung von Adrenalin auf die Schlagfrequenz isolierter Herzen verschiedener Tierarten*

	Zahl der Versuche	Temp. ° C	Ausgangsfrequenz (Herzschläge pro Minute)	Adrenalin-Dauerinfusion		mittlere Frequenz zunahme	Medium
				Dosis (in μg/min/l)	Frequenz (Herzschläge pro Minute)		
Frosch	28	20	25 ± 0,87	7	53 ± 0,78	28	Frosch-Ringer
Hund[1]	80	38,3	141	3	213	72	Blut
Hund[2]	5	38,7	146	7	232	86	Blut
Meerschweinchen	37	37,5	210 ± 6,3	7	306 ± 7	96	Krebs-Henseleit
Ratte	21	37,5	260 ± 6,3	7	420 ± 7,8	160	Krebs-Henseleit

[1] Krayer u. Benforado (1955).
[2] Krayer (1949).

daß die Steigerungsfähigkeit der Herzfrequenz auf die gleiche Adrenalindosis mit steigender Ausgangsfrequenz zunimmt.

II. Beeinflussung der frequenzsteigernden Adrenalinwirkung durch Veratramin und Chinidin bei verschiedenen Herzarten

1. Veratramin. Die von Krayer 1949 am isolierten Hundeherzen beobachtete Hemmung der frequenzsteigernden Adrenalinwirkung durch Veratramin läßt sich auch an den Herzen bzw. Vorhöfen von Fröschen, Meerschweinchen und Ratten nachweisen.

Die Abb. 3 zeigt einen Versuch mit einem Froschherzen. Über der Frequenzkurve des Ordinatenschreibers liegt die Kurve des isotonischen Hebels, die die jeweilige Hubhöhe des Froschventrikels wiedergibt. Es ist daraus ersichtlich, daß die mit Beginn der Adrenalininfusion einsetzende inotrope Wirkung auf den Herzmuskel auch bei der durch steigende Dosen von Veratramin bedingten Abnahme der Frequenz anhält. Wie die Abbildung weiter zeigt, setzt die durch Veratramin verursachte Frequenzverminderung nicht plötzlich ein, sie entwickelt sich vielmehr erst in mehreren Minuten zu ihrem vollen Ausmaß. Noch deutlicher ist die Verzögerung des Eintritts der Veratraminwirkung bei den isolierten Vorhöfen von Meerschweinchen und Ratten. Bei dem in Abb. 4 dargestellten Versuch mit einem Meerschweinchenvorhof dauert es je nach der Veratramindosis zwischen 5 und 45 min bis zur vollen Ausbildung

der Wirkung. Dies entspricht dem Wirkungscharakter des Veratrosins, des Glykosids des Veratramins, am Hundeherzen (KRAYER, 1950a). Demgegenüber setzt die Wirkung des Veratramins am Hundeherzen abrupt ein und hat in 1—2 min ihr Maximum erreicht.

Die Reizbildung in den Herzen der verschiedenen Tierarten wird durch Veratramin verschieden stark beeinflußt. In der Abb. 5 ist die als Antiacceleranswirkung bezeichnete Verringerung der durch Adrenalindauerinfusion (7 μg min l) verursachten Frequenzsteigerung gegen die

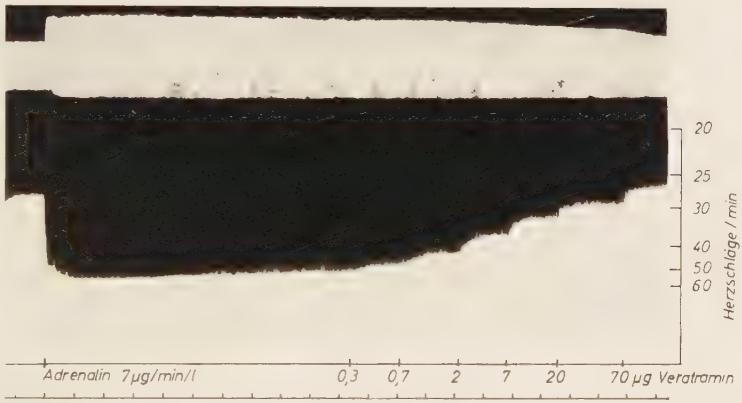


Abb. 3. Wirkung von Veratramin auf Hubhöhe und Schlagfrequenz des isolierten Froschherzens bei fortlaufender Adrenalininfusion. Kurven von oben nach unten: Hubhöhe des Ventrikels; Frequenzkurve des Ordinatenschreibers (Eichung auf der Ordinate rechts). Auf der Basislinie des Ordinatenschreibers Markierung des Beginns der Adrenalininfusion und der Veratraminzusätze. Darunter Zeitmarkierung in Abschnitten von 10 min

Dosis Veratramin in Mol/l aufgetragen. In diese Übersicht wurden auch die von KRAYER (1950a) mitgeteilten Werte von isolierten Hundeherzen aufgenommen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte dabei in der Annahme, daß das Lösungsvolumen im Herz-Lungen-Präparat des Hundes durchschnittlich 1000 ml beträgt. Die verwendete Adrenalindosis war bei den aufgeführten Hundeversuchen zwar etwas geringer (3 μg min/l), doch läßt sich die Dosiswirkungskurve der Hundeherzen mit den Kurven der anderen Herzarten qualitativ sicher vergleichen, vor allem da anzunehmen ist, daß sich bei höherer Adrenalinkonzentration der bestehende Unterschied zwischen der Hundekurve und denen der anderen Tiere noch vergrößern würde. Der Vergleich der Dosiswirkungskurven ergibt, daß für 50% Antiacceleranswirkung beim Rattenherzen etwa fünfmal und beim Hundeherzen zehnmal mehr Veratramin erforderlich ist als beim Meerschweinchenherzen. Die Empfindlichkeit des Froschherzens gegen Veratramin liegt zwischen der des Meerschweinchen- und der des Rattenherzens. Die Formen der einzelnen Kurven lassen erkennen, daß in der Wirkungsweise des Veratramins bei den

einzelnen Herzarten Unterschiede bestehen. Bei den Meerschweinchenherzen gelingt es leicht, durch Erhöhung der Veratramindosis die Schlagfrequenz unter den Ausgangswert zu senken, was in dem steilen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve oberhalb der 100% Antiacceleranswirkung zum Ausdruck kommt. Die Kurven der Frosch-, der Ratten- und der Hundeherzen dagegen flachen gegen die 100% Grenze hin deutlich ab. Sowohl bei Froschherzen, wie auch bei Rattenherzen (und dies gilt

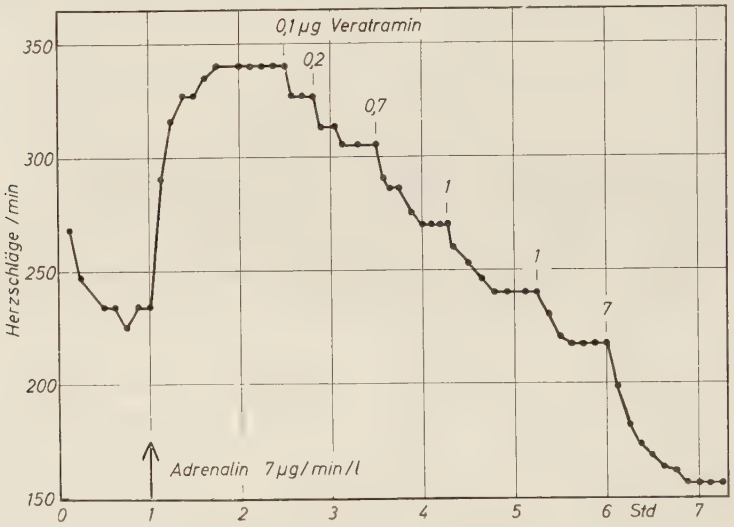


Abb. 4. Wirkung von Veratramin auf die Schlagfrequenz eines isolierten Meerschweinchenvorhofs bei fortlaufender Adrenalininfusion. Abszisse: Zeit in Stunden

offensichtlich auch für das Hundeherz — Krayer, Arora u. Meilman) gelingt es nur in einem geringen Teil der Versuche, die Schlagfrequenz durch hohe Veratramindosen ohne Auftreten von Irregularität über die 100% Antiacceleranswirkung weiter zu senken. Von den Rattenvorhöfen mußten schon nach Veratramindosen mit 30% Antiacceleranswirkung einige wegen auftretender Arrhythmie aus dem weiteren Versuch ausscheiden, während von allen untersuchten Meerschweinchenvorhöfen nur einer nach einer Veratramindosis, die über 130% Antiacceleranswirkung verursachte, unregelmäßig wurde.

Gibt man isolierten Meerschweinchenvorhöfen, die nicht unter Adrenalineinwirkung stehen, Veratramin in steigenden Dosen, so nimmt die Schlagfrequenz regelmäßig ab. Trägt man die Frequenzverminderung (in Herzschlägen pro Minute) gegen die Dosis Veratramin auf, sowohl bei den nicht mit Adrenalin behandelten wie bei den Vorhöfen mit Adrenalininfusion, so erhält man zwei annähernd parallellaufende Kurven, deren rechte sich auf die nicht mit Adrenalin behandelten Vorhöfe

bezieht. Für eine Abnahme der Frequenz um 50 Schläge pro Minute wird bei unbehandelten Meerschweinchenvorhöfen (von der Ausgangsfrequenz 210) doppelt soviel Veratramin gebraucht wie bei Adrenalindauerinfusion (ausgehend von der Frequenz 306). Eine Abnahme der Frequenz unter 100 pro Minute läßt sich nur schwer erreichen.

2. Chinidin. Auch Chinidin und Chinin heben die chronotrope Adrenalinwirkung am Hundeherzen auf (KRAYER, 1950b), allerdings

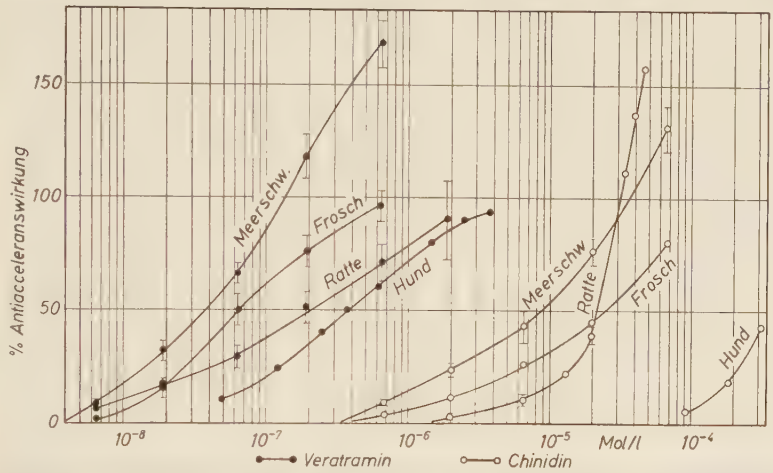


Abb. 5. Dosiswirkungskurven für die Antiacceleranswirkung von Veratramin und Chinidin bei Herzen verschiedener Tierarten. Die Werte für Hundeherzen sind den Arbeiten von KRAYER, 1949 und 1950b entnommmen

treten schon vor der vollständigen Antiacceleranswirkung beim Hundeherzen Rhythmusstörungen auf. Bei Meerschweinchen- und Rattenvorhöfen läßt sich durch Chinidin die Schlagfrequenz, wie aus der Dosis-Wirkungskurve in Abb. 5 hervorgeht, noch unter den Ausgangswert senken. Ebenso wie nach Veratramin erfolgt die Frequenzverminderung bei Meerschweinchenvorhöfen in der Regel ohne Auftreten von Irregularität, während bei den Rattenvorhöfen schon nach Dosen Chinidin mit etwa 40% Antiacceleranswirkung ein großer Teil irregulär wurde. Die Punkte des oberen steilen Teils der Kurve sind daher nur aus wenigen Werten gewonnen. Die Froschwerte beziehen sich nur auf einen Versuch, bei ihm trat keine Rhythmusstörung auf. Die für 50% Antiacceleranswirkung notwendigen Chinidindosen sind bei den Meerschweinchenvorhöfen etwa 200mal, bei den Rattenvorhöfen 100mal und beim Frosch etwa 300mal größer als die Veratramindosen.

Diskussion

Die Tatsache, daß die frequenzsteigernde Wirkung von Adrenalin bei den untersuchten Herzarten in der Reihenfolge: Ratte, Meerschweinchen, Hund, Frosch abnimmt, die zur Aufhebung dieser Wirkung bei

den verschiedenen Tieren notwendigen Veratraminkonzentrationen jedoch eine völlig andere Reihenfolge ergeben nämlich: Meerschweinchen, Frosch, Ratte, Hund, läßt sich schwer mit der Anschauung vereinbaren, daß es sich bei der Veratraminwirkung um eine reine Konkurrenzhemmung gegenüber Adrenalin am gleichen Receptor, um einen „competitive antagonism" handele. Gegen diese Anschauung spricht auch die bei voller Antiacceleranswirkung erhaltene positiv inotrope Adrenalinwirkung und ferner der Umstand, daß zumindest bei den Meerschweinchenvorhöfen die Veratraminwirkung über die Antiacceleranswirkung weit hinausgeht und von der Adrenalinwirkung unabhängig ist. Es scheint sich vielmehr bei den Wirkungen beider Substanzen um einen *funktionellen Antagonismus* zu handeln. Und es gibt Anhaltspunkte dafür, daß dieser Antagonismus *auf der gegensinnigen Einwirkung beider Substanzen auf verschiedene Abschnitte des Zellstoffwechsels beruht.*

Adrenalin bewirkt bekanntlich eine vermehrte Bildung von Glucosephosphat (Hegnauer u. Cori). Die bei erhöhtem Umsatz von Glucosephosphat vermehrt anfallende Brenztraubensäure wird im Herzmuskel über den Tricarbonsäurecyclus oxydativ abgebaut und führt damit zu einer erhöhten Sauerstoffaufnahme. Nach den Untersuchungen von Webb, sowie von Gardner, Wilson u. Farah, über die unterschiedliche Beeinflussung von Reizbildung und Kontraktionskraft des Warmblütervorhofs durch verschiedene Stoffwechselsubstrate besteht eine enge Verknüpfung zwischen der Schlagfrequenz und dem oxydativen Abbau der Brenztraubensäure. Auf der gleichen Ebene liegen die Ergebnisse von Nickerson über die Hemmung der chronotropen Adrenalinwirkung durch Fluoressigsäure beim Froschherzen ohne Beeinflussung der inotropen Wirkung. Hier steht die Hemmung der Bildung von „aktiver Essigsäure" aus Brenztraubensäure und damit die Hemmung des weiteren oxydativen Abbaues in Parallele zur selektiven Hemmung der chronotropen Adrenalinwirkung. Auch Veratramin hemmt isoliert die oxydative Verbrennung im Tricarbonsäurecyclus, ohne den anaeroben Abbau bis zur Brenztraubensäure zu beeinflussen (Reiter). Es liegt daher nahe, zwischen dieser Stoffwechselwirkung und der parallellaufenden negativ chronotropen Wirkung eine kausale Beziehung anzunehmen. Kosterlitz, Krayer u. Matallana vermuten, daß für die normale Aktivität des Reizbildungszentrums eine unbekannte Substanz X notwendig sei, deren Entstehung durch die hemmende Wirkung des Veratramins auf den oxydativen Stoffwechsel beeinträchtigt würde.

Für das Vorliegen einer gegensinnigen Stoffwechselbeeinflussung sprechen auch die Versuche mit Chinidin. Diese Substanz unterscheidet sich von Veratramin in seiner Antiacceleranswirkung, wie aus Abb. 5 hervorgeht, durch seine geringere Aktivität. Darüber hinaus besteht aber hinsichtlich der Beeinflussung der inotropen Adrenalinwirkung zwischen beiden Substanzen noch ein wesentlicher Unterschied. Während die inotrope Adrenalinwirkung durch die Antiacceleranswirkung des Veratramins nicht beeinflußt wird, hebt Chinidin zusammen mit der chronotropen auch die inotrope Adrenalinwirkung auf und führt sogar zur Insuffizienz des Herzens (Krayer, 1950b).

Auch Chinidin bewirkt eine Hemmung des Herzstoffwechsels, jedoch im Gegensatz zum Veratramin im *anaeroben* Teil des Kohlenhydratabbaues (Webb,

Saunders u. Nakamura). Damit wird die Energiebildung offensichtlich so umfassend beeinträchtigt, daß die Kontraktionsfähigkeit des Herzmuskels darunter leidet. Die durch die Stoffwechselhemmung bewirkte Verminderung der Sauerstoffaufnahme bei Chinidin wurde an ruhenden Rattenvorhöfen von Webb, Saunders u. Nakamura gemessen. Die für eine 20%ige Atmungshemmung notwendige Dosis Chinidin verhält sich zu der bei Rattenvorhöfen die gleiche Atmungshemmung bewirkenden Veratramindosis (Reiter) wie 100 : 1 (20% Hemmung der O_2-Aufnahme *ruhender* Rattenvorhöfe bei $3 \cdot 10^{-4}$ mol Chinidin und $3 \cdot 10^{-6}$ mol Veratramin; 10%ige Hemmung bei $1 \cdot 10^{-4}$ mol Chinidin und $1 \cdot 10^{-6}$ mol Veratramin). Das Verhältnis der Konzentrationen von Chinidin und Veratramin, die an isolierten Rattenvorhöfen 50% Antiacceleranswirkung verursachen, beträgt ebenfalls etwa 100 : 1 (Abb. 5).

Summary

The effects of epinephrine, veratramine and quinidine on the impulse formation in the isolated heart of various animal species has been studied:

1. Continuous infusion of epinephrine (7 μg./min./l.) increased the rate of isolated frog hearts by 28, the rate of isolated auricles of guinea pigs by 96 and of rats by 160 beats per minute.

2. The positive chronotropic action of epinephrine could be antagonized by veratramine. For 50% antiaccelerator action different concentrations of veratramine are necessary in the different species, namely $3{,}8 \cdot 10^{-8}$ mol./l. with guinea pig auricles, $6{,}3 \cdot 10^{-8}$ with frog hearts and $2 \cdot 10^{-7}$ with rat auricles, while in the isolated heart of the dog $4 \cdot 10^{-7}$ mol./l. are necessary (Krayer).

The antiaccelerator action of quinidine is observed with concentrations which are 100—300 times higher than those of veratramine.

3. In the various species the sensitivities toward the chronotropic action of epinephrine and toward the action of veratramine do not parallel each other. This suggests that the antagonism between the two substances is not competitive in nature.

4. A new contact lever for the measurement of the rate of isolated auricles has been described.

Frau Juliane Noé hatte einen maßgebenden Anteil an der Durchführung der Versuche.

Literatur

Amsler, C.: Zbl. Physiol. **31**, 467 (1916). — Forst, A. W., u. K. Heuwing: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 349 (1953). — Gardner, E. A., M. Wilson and A. Farah: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 166 (1954). — Hegnauer, A. H., and G. T. Cori: J. of Biol. Chem. **105**, 691 (1934). — Kosterlitz, H. W., O. Krayer and A. Matallana: J. of Pharmacol. **113**, 460 (1955). — Krayer, O.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 442 (1949); **98**, 427 (1950 a); **100**, 146 (1950 b). — Krayer, O., R. B. Arora u. E. Meilman: J. Pharmacol. **113**, 446 (1955). — Krayer, O., u. J. M. Benforado: Pflügers Arch. **260**, 177 (1955). — Krebs, H. A., u. K. Henseleit: Z. physiol. Chem. **210**, 33 (1932). — Nickerson, M., and G. M. Nomaguchi: Amer. J. Physiol. **163**, 484 (1950). — Reiter, M.: J. Pharmacol. **99**, 132 (1950). — Webb, J. L., P. R. Saunders and K. Nakamura: J. Pharmacol. **101**, 287 (1951). — Webb, J. L.: Brit. J. Pharmacol. **5**, 87 (1950).

Dr. M. Reiter, München, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 242—252 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. Fritz Eichholtz)

Zur Frage des tubulären Maximums der Orthophosphatrückresorption*

Von

R. Taugner, E. Schmid, M. v. Bubnoff**, H. Hochrein u. F. Dorschner

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. April 1956)

Aus später anzuführenden Gründen war versucht worden, die Größe der Orthophosphatrückresorption an drei trainierten Hunden zu bestimmen (vgl. Taugner u. Mitarb.). Dies schien nach den Angaben von Harrison u. Harrison sowie Pitts u. Alexander für gewisse höhere Plasmaspiegel recht einfach: Die Rückresorption von anorganischem Phosphat ist nach diesen Autoren beim Hund — ähnlich wie die von Glucose — durch ein tubuläres Maximum beschränkt, das bei Plasmakonzentrationen von 5—7 mg-%[1] erscheinen und eine individuelle Konstante darstellen soll (vgl. auch Jahan u. Pitts, Ayer, Schiess u. Pitts sowie Hogben u. Bollmann).

Es zeigte sich jedoch schon bei den ersten Versuchen, daß die Größe der Orthophosphatrückresorption bei Infusion von anorganischem Phosphat nicht immer konstante Werte annimmt. Vor allem ergaben sich — auch bei Plasmakonzentrationen, die nach den obengenannten Autoren schon zur Sättigung des Rückresorptionsmechanismus genügen — unerwartete Zusammenhänge zwischen Rückresorptionsgröße und Infusionsgeschwindigkeit. Wir hielten es daher für erforderlich, die als abgeschlossen geltende Frage des tubulären Maximums für Orthophosphat (Tm P) erneut zu bearbeiten. Die Versuche führten zu einer wesentlichen Komplikation der anfangs so einfach erscheinenden Verhältnisse. Das Tm P stellt danach keine individuell konstante Größe dar; es erhebt sich sogar die Frage, ob seine Existenz überhaupt noch als gesichert gelten kann.

---

* Eine vorläufige Mitteilung der Ergebnisse erfolgte auf der 22. Tagung der Dtsch. Pharmakol. Gesellsch., Graz 5.—7. Sept. 1955.

** Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

[1] Alle Zahlenangaben beziehen sich auf die Konzentration von P und nicht etwa von PO_4.

Methodik

Als Versuchstiere dienten drei Hündinnen (Senta, Schäferbastard, 26 kg; Bibela, Schäferbastard, 24 kg; Hella, Dobermann, 25 kg). Die Tiere erhielten nach 12stündigem Hungern zur ausreichenden Hydrierung etwa 1,5 l Trinkwasser, wurden 30—40 min später auf einen Operationstisch gelagert und mit einem Dauerkatheter versehen, Infusionen erfolgten mittels Flügelkanülen in eine Vene der rechten hinteren Extremität, meist die V. saphena. Die Blutentnahmen wurden — ebenfalls mit Flügelkanülen — ohne Stauung aus einer Jugularvene, in seltenen Fällen aus einer Vene der vorderen Extremität entnommen. Die Punktionsstellen wurden zu Versuchsbeginn mit 0,2—0,4 cm³ einer 2%igen Novocainlösung infiltriert. Da der Phosphatgehalt von arteriellem und venösem Blut sich nach Pitts u. Alexander sowie nach eigenen Kontrollversuchen an narkotisierten Tieren praktisch nicht unterscheidet, konnte auf Arterienpunktion verzichtet werden.

Die erste Clearanceperiode erfolgte 60—90 min nach der Wassergabe und 30 min nach Beginn der Infusion von 5 cm³ isotonischer Kochsalzlösung pro Minute. Nach 10 min wurden der Kochsalzlösung Kreatinin (4 g/l) und Orthophosphat (NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 im Verhältnis 1:4) zugesetzt. Zur Erzielung verschieden hoher, ansteigender Plasmaspiegel verwendeten wir 6 Orthophosphat-Lösungen mit einem Gehalt von 125, 275, 425, 525, 650 und 850 mg-% P. Zur Vermeidung von Gerinnseln wurden auch in die Jugularvene 2—3 cm³ isotonischer Kochsalzlösung pro Minute infundiert.

Die Entleerung der Blase erfolgte manuell, und zwar bei Diuresen von mehr als 5 cm³/min ohne nachfolgende Spülung. Bei geringerer Diurese wurde mit 10—20 cm³ körperwarmer NaCl-Lösung nachgespült.

Blutentnahmen wurden Mitte der ersten und dritten, öfters auch in allen drei Perioden eines Versuchsabschnittes durchgeführt, die Plasmaspiegel später nach Bedarf interpoliert. Die Blutproben wurden sofort nach der Entnahme in Eiswasser gekühlt und zentrifugiert, das Plasma abpipettiert, Kreatininbestimmungen erfolgten nach Lieb u. Zacherl, Phosphatbestimmungen nach Fiske u. Subbarow. Zur Verhinderung der Blutgerinnung diente Thrombozid[1].

Die Phosphatfiltration wurde, wie üblich, aus dem Glomerulusfiltrat (in cm³/min) und dem Plasmaphosphatspiegel (in mg/cm³) errechnet. Der Donnan-Faktor wurde dabei vernachlässigt. Die Rückresorption ergab sich aus der Differenz zwischen filtriertem und ausgeschiedenem Phosphat.

Nach Zufuhr größerer Phosphatmengen traten leichte Tetaniesymptome wie Erbrechen, Muskelsteifigkeit und -zuckungen, sowie Benommenheit und Apathie auf. Wir injizierten daher sofort nach Versuchsende 10 cm³ einer 20%igen Ca-Gluconat-Lösung[2] und erreichten dadurch rasche Besserung. An einem Tier wurde wöchentlich höchstens 1 Versuch durchgeführt.

Versuchsergebnisse

Für die ursprünglich beabsichtigte Bestimmung der Rückresorptionskapazität wurde der Plasmaspiegel nach dem Vorgehen von Pitts u. Alexander durch Infusion zunehmend konzentrierter Orthophosphatlösungen stufenweise erhöht. Da jede Stufe aus drei Clearanceperioden bestand, bis zur Einstellung konstanter Verhältnisse außerdem ein

[1] Für die freundliche Überlassung von Thrombozid danken wir der Firma Dr. W. Benend, München-Solln.

[2] Diese wurde uns freundlicherweise von der Sandoz-AG, Nürnberg, zur Verfügung gestellt.

Vorlauf von 15—20 min erforderlich war, dauerte jeder Versuchsabschnitt etwa 50 min. Zur Vermeidung der von Hogben u. Bollmann beobachteten Ermüdung der Rückresorption sollten in einem Versuch nur 3—4 Phosphatlösungen verwendet werden. Die Erzeugung von Plasmakonzentrationen über 20 mg-% gelang dabei jedoch nur durch anfängliche Infusion größerer Phosphatmengen, z. B. der Lösungen 3 oder 4. Die Ergebnisse waren dabei ohne Ausnahme uneinheitlich und grundsätzlich verschieden von jenen solcher Versuche, wo ähnliche Plasmaspiegel langsamer, etwa durch aufeinanderfolgende Infusion der Lösungen 1, 2, 3 und 4 erzeugt wurden.

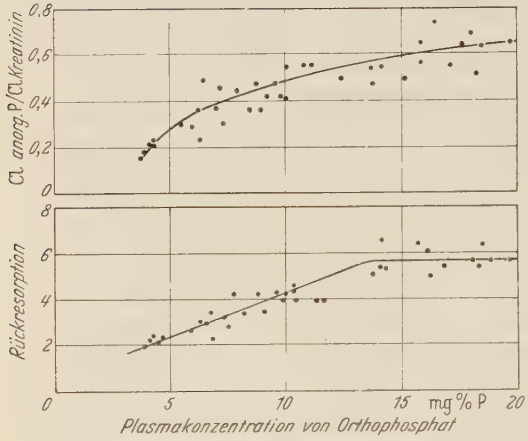


Abb. 1. Quotient $\frac{\text{Clearance Orthophosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$ (oben) und Rückresorption von Orthophosphat in Milligramm/Minute (unten) bei langsamer Infusion von Orthophosphat an Bibela. Nähere Erläuterung im Text

Langsame Erhöhung des Phosphatspiegels führte zu Ergebnissen, die im Prinzip mit denen von Pitts u. Mitarb. übereinstimmen[1]. Bei Bibela z. B. wurden einmal die Lösungen 1, 2, 3 und 4 sowie zweimal die Lösungen 2, 3, 4 und 5 infundiert. Entsprechend Abb. 1 steigt die Rückresorption in diesen Versuchen zunächst mit dem Plasmaspiegel an, um sich schließlich bei etwa 14 mg-% auf eine annähernd konstante Größe von 5—6 mg P/min einzustellen. Dieser, nach unserer anfänglichen Meinung die maximale Rückresorptionsleistung darstellende Wert liegt jedoch um 20—50% höher als in den Versuchen von Pitts u. Mitarb.; er wird außerdem erst bei wesentlich höherer Orthophosphatbelastung erreicht (vgl. Herzfeld u. Mitarb.).

Ähnliche Abweichungen finden sich im Verhältnis $\frac{\text{Clearance Orthophosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$: Dieser Quotient nähert sich zwar auch in unseren Versuchen der Asymptote 1,0; die Kurve verläuft jedoch etwas steiler, so daß Werte von etwa 0,6 z. B. schon bei Plasmakonzentrationen von etwa 15 mg-% und nicht, wie bei Pitts u. Alexander, erst bei 19—20 mg-% erreicht werden.

Bei Senta und Hella waren die Ergebnisse weniger einheitlich und wichen trotz langsamer Infusion noch weiter von den Pittsschen

[1] Auch in späteren Versuchen mit Fructosediphosphat, wo der Orthophosphatspiegel durch die hydrolytische Spaltung dieses Esters in jedem Fall langsam und gleichmäßig anstieg, wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei langsamer Infusion von Orthophosphat (vgl. Taugner u. Mitarb.).

Befunden ab. Annähernd konstante, aber unerwartete Rückresorptionswerte von etwa 8,5 bzw. 9 mg P/min stellten sich erst bei Plasmakonzentrationen von 11 bzw. 13 mg-% ein (Abb. 2b; vgl. auch Tab. 1b).

Wurden derartige Phosphatspiegel bei allen Tieren jedoch nicht innerhalb von 1½—2 Std, sondern rascher, etwa in 15—20 min erzeugt, so war die errechnete Rückresorption noch wesentlich größer. In Abb. 2a ist z. B. ein Versuch an Hella mit anfänglicher Infusion der Lösungen 3 und 4

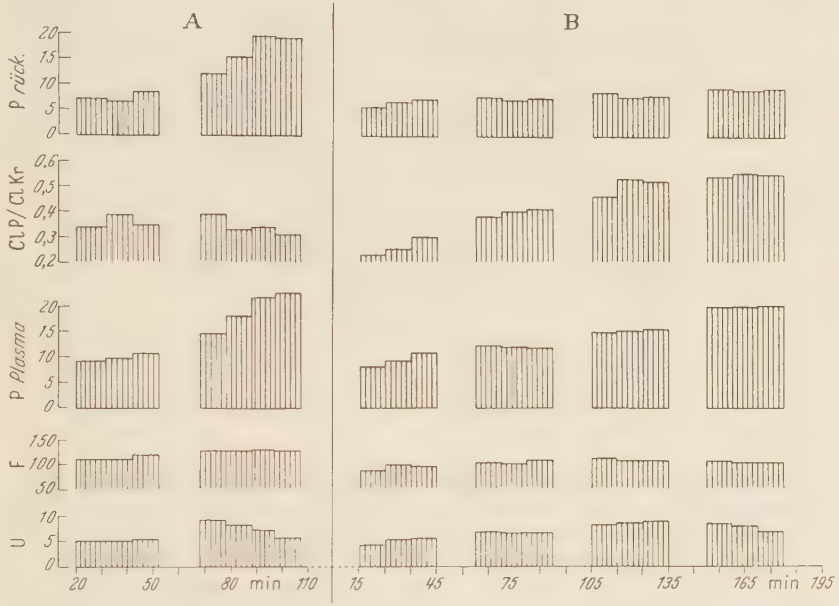


Abb. 2. Rasche *(A)* und langsame *(B)* Infusion von Orthophosphat an Hella. Von oben nach unten: Rückresorption von Orthophosphat (mg/min), Quotient $\frac{\text{Clearance Orthophosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$, Plasma-P (mg-%), Filtrationsgröße (cm³/min) und Diurese (cm³/min). *A*: Infusion der Lösungen 3 und 4; *B*: Infusion der Lösungen 2, 3, 4 und 5. In den letzten Clearanceperioden beider Versuche sind die Rückresorptionswerte trotz gleicher Plasmaspiegel deutlich verschieden. Nähere Erläuterung im Text

wiedergegeben. Der Phosphatspiegel stieg innerhalb des ersten Versuchsabschnittes von 9,5 auf 10,9, innerhalb des zweiten von 14,9 auf 22,7 mg-% an; die Rückresorption betrug dabei bis zu 19,5 mg P/min. Da die Plasmakonzentration während der letzten Clearanceperioden auffallend rasch zunimmt, könnte man daran denken, daß die Rückresorption hier durch den toten Raum nur scheinbar vermehrt wurde. Angemessene Korrekturen des toten Raums lassen jedoch die errechnete Rückresorption um höchstens 10—15% geringer erscheinen: die Werte liegen dabei immer noch um fast 100% höher als in den Versuchen mit langsamer Steigerung der Plasmakonzentration.

In einigen Versuchen dieser Art erscheint der tote Raum als Fehlerquelle von vornherein ausgeschlossen: Höhere Plasmakonzentrationen können bei Infusion der Lösungen 3 und 4 nämlich auch so entstehen, daß der Phosphatspiegel zwar im Vorlauf rascher ansteigt, während der Clearanceperiode dagegen nur unwesentlich, z. B. von 11,1 auf 12,9 bzw. von 16,5 auf 17,2 mg-% erhöht wird (Tab. 1a). Die Größe der Rückresorption beträgt auch dabei bis zu 12 mg P/min und ist damit um rund

Tabelle 1a. *Filtration, Rückresorption und Ausscheidung von anorganischem Phosphat bei rascher Infusion von Orthophosphat.* (Lösungen 3 und 4.) Senta, 26 kg

Zeit min	Diurese cm^3/min	Kreat. Clear. cm^3/min	Orthophosphat-P				Clear. anorg. P / Clear. Kreat.
			Plasma-P mg-%	Filtriert mg/min	Ausgeschieden mg/min	Rückresorbiert mg/min	
55—70	Infusion von Lösung 3 mit 225 mg-% P, 5 cm^3/min						
70—80	7,1	108	11,1	12,0	3,1	8,9	0,26
80—90	7,85	105	11,4	12,0	3,59	8,41	0,3
90—100	8,75	112	12,9	14,4	4,6	9,8	0,319
100—114	Infusion von Lösung 4 mit 355 mg-% P, 5 cm^3/min						
114—124	9,74	119	16,5	18,4	8,52	9,88	0,432
124—134	9,74	121	16,5	20,0	9,9	11,1	0,492
134—144	9,43	124	16,9	21,0	9,0	12,0	0,427
144—155	9,4	120	17,2	20,6	9,4	11,2	0,46

Nähere Erläuterung siehe Text

Tabelle 1b. *Filtration, Rückresorption und Ausscheidung von anorganischem Phosphat bei langsamer Infusion von Orthophosphat.* (Lösungen 2, 3, 4 und 5.) Senta, 26 kg

Zeit min	Diurese cm^3/min	Kreat. Clear. cm^3/min	Orthophosphat-P				Clear. anorg. P / Clear. Kreat.
			Plasma-P mg-%	Filtriert mg/min	Ausgeschieden mg/min	Rückresorbiert mg/min	
40—59	Infusion von Lösung 2 mit 142 mg-% P, 5 cm^3/min						
59—71	6,99	93	6,7	6,2	1,37	4,83	0,22
71—81	7,7	101	7,6	7,65	2,43	5,22	0,32
81—92	7,9	102	7,63	7,75	2,7	5,05	0,345
92—107	Infusion von Lösung 3 mit 225 mg-% P, 5 cm^3/min						
107—117	8,51	105	9,2	9,62	3,7	5,92	0,385
117—127	8,5	102	9,65	10,0	3,36	6,64	0,345
127—140	9,73	103	10,2	10,5	4,2	6,33	0,4
140—155	Infusion von Lösung 4 mit 355 mg-% P, 5 cm^3/min						
155—165	10,73	105	12,4	13,0	7,3	5,7	0,56
165—175	10,93	110	14,7	16,8	8,45	8,35	0,52
175—187	nicht bestimmt						
187—205	Infusion von Lösung 5 mit 432 mg-% P, 5 cm^3/min						
205—215	8,7	103	17,6	18,2	10,8	7,4	0,6
215—225	6,6	106	17,65	18,8	11,7	7,1	0,6
225—235	4,55	113	17,7	20,0	10,75	9,25	0,54

Nähere Erläuterung siehe Text

Tabelle 1c. *Filtration, Rückresorption und Ausscheidung von anorganischem Phosphat bei langsamer Infusion von Orthophosphat.* (Lösungen 2, 3, 4 und 5). Senta, 26 kg

Zeit min	Diurese cm³/min	Kreat. Clear. cm³/min	Orthophosphat-P				Clear. anorg. P / Clear. Kreat.
			Plasma-P mg-%	Filtriert mg/min	Ausgeschieden mg/min	Rückresorbiert mg/min	
35—51	Infusion von Lösung 2 mit 142 mg-% P, 5 cm³/min						
51—60	6,94	103	10,8	11,1	1,39	9,7	0,126
60—69	7,7	110	13,3	14,6	2,54	12,1	0,174
69—79	8,23	111	16,8	18,6	3,18	15,4	0,172
79—95	Infusion von Lösung 3 mit 225 mg-% P, 5 cm³/min						
95—104	8,94	115	18,3	21,0	6,01	15,0	0,286
104—113	8,42	106	18,8	19,7	5,58	14,1	0,286
113—122	9,3	103	19,2	19,8	6,18	13,6	0,311
123—139	Infusion von Lösung 4 mit 355 mg-% P, 5 cm³/min						
139—149	10,5	105	20,4	21,3	8,58	12,7	0,401
149—159	12,2	112	20,5	22,8	11,95	10,8	0,52
159—169	11,1	111	20,6	22,8	12,4	10,4	0,54
169—185	Infusion von Lösung 5 mit 432 mg-% P, 5 cm³/min						
185—195	8,3	107	25,5	27,3	14,1	13,2	0,513
195—205	6,7	108	26,2	28,2	14,2	14,0	0,5
205—215	5,55	113	26,9	30,4	15,2	15,2	0,503

Nähere Erläuterung siehe Text

30% größer als bei langsamer Einstellung der gleichen Phosphatkonzentration (Tab. 1b)*.

Da diese Beobachtungen der Annahme einer konstanten tubulären Rückresorptionskapazität widersprachen, wurden die Zusammenhänge zwischen Rückresorptionsgröße und Infusionsgeschwindigkeit ausführlicher untersucht (vgl. Abb. 3). Zum Auftreten ausnehmend hoher Rückresorptionswerte scheint danach ein Anstieg der Orthophosphatkonzentration um 8—9 mg-% innerhalb von etwa 30 min erforderlich zu sein. Dabei ist es gleichgültig, ob diese rasche Erhöhung während der betreffenden Clearanceperioden oder 15—30 min vorher erfolgt. Blieb die Phosphatkonzentration danach über längere Zeit konstant, so fiel die anfangs erhöhte Rückresorption meist auf die bei langsamer Infusionsgeschwindigkeit beobachteten Werte ab (Versuch Nr. 4 und 5 in Abb. 3). Neben der Anstiegsgeschwindigkeit ist nach unserer Erfahrung auch die Höhe des Phosphatspiegels von Bedeutung. Die überhöhten Rückresorptionswerte traten nur bei Plasmakonzentrationen von mindestens 13 bis 16 mg-% auf.

Gewisse Beobachtungen sprechen dafür, daß neben Infusionsgeschwindigkeit und Orthophosphatkonzentration auch noch weitere, bisher unbekannte Faktoren die Rückresorptionsgröße entscheidend beein-

* Der tote Raum müßte sich als Fehlerquelle während der ersten Clearance-Periode, also jeweils kurz nach dem steilen Anstieg des Phosphatspiegels, besonders deutlich auswirken. Die Phosphatrückresorption war aber auch weiterhin über 30 min meist konstant.

flussen können. Infusion der Lösungen 2, 3, 4 und 5 z. B. führte bei Senta und Hella einmal zu Ergebnissen, die im wesentlichen denen von Abb. 1 an Bibela entsprachen (Tab. 1b). Die größten Rückresorptionswerte lagen dabei um 9 mg P/min. Wiederholung der gleichen Versuche ergab dagegen ein durchaus verschiedenes Bild. Die Rückresorption stieg in diesem Fall auf Werte zwischen 14 und 15 mg P/min an (Tab. 1c). Diese Abweichungen traten in jedem Fall während bzw. kurz nach steilen Erhöhungen des Plasmaspiegels auf, wie sie in den ersten Versuchen nicht vorkamen. Dementsprechend war auch der Phosphatspiegel am Ende der

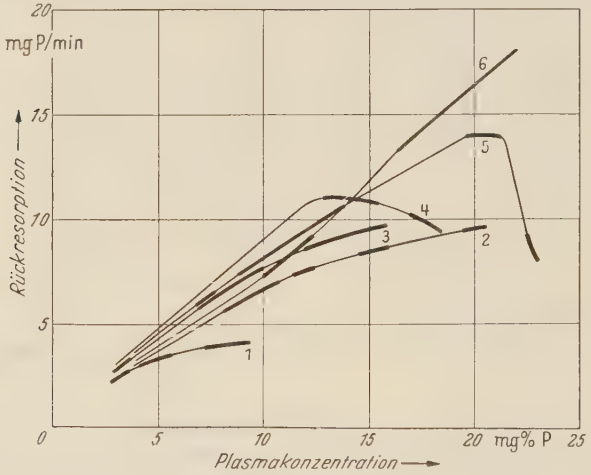


Abb. 3. Halbschematische Darstellung 6 verschiedener Versuche an Hella. Abstand zwischen den einzelnen Versuchen mindestens 7 Tage. Die Rückresorption ist gegen die jeweiligen Phosphatspiegel aufgetragen. Die schwach ausgezogenen Abschnitte der einzelnen „Schwerpunktslinien" stellen jeweils die Vorperiode ohne Clearancebestimmungen, die stärker ausgezogenen die eigentlichen 3 Clearanceperioden dar. Die Vorperioden dauerten meist 15—20 min, die darauffolgenden 3 Clearanceperioden zusammen 30 min. Da diese Zeiten weitgehend konstant waren, läßt sich aus der Länge der einzelnen Abschnitte die Steilheit des Phosphatspiegelanstieges abschätzen. Es wird ersichtlich, dass die Rückresorption bei rascher Erhöhung des Phosphatspiegels (lange Abschnitte) relativ hoch, bei langsamer Erhöhung des Phosphatspiegels (kurze Abschnitte) dagegen niedrig ist

Versuche hier stärker, nämlich anstatt auf 17,7 bzw. 20 mg-% auf 26,9 bzw. 22,5 mg-% erhöht, obwohl in allen Versuchen etwa die gleiche Phosphatmenge, und zwar 3060, 3200 und zweimal 3000 mg infundiert wurden. Auch die Filtrationsgröße war in beiden Versuchen sowohl bei Hella als auch bei Senta praktisch identisch. Das gesamte im Urin ausgeschiedene Phosphat betrug 1200—1900 mg und wies keinerlei Zusammenhang mit der verschiedenen Rückresorptionsgröße auf.

Diskussion

Nach den vorliegenden Ergebnissen an 3 Hunden stellt sich die Rückresorption von anorganischem Phosphat nur bei bestimmten langsamen Infusionsgeschwindigkeiten auf konstante, den Eindruck eines Tm P er-

weckende Werte ein. Da es sich dabei um höhere Plasmakonzentrationen und größere Rückresorptionswerte handelt als in den Versuchen von Pitts u. Mitarb., wären besonders hohe Rückresorptionskapazitäten unserer Versuchstiere anzunehmen (vgl. Herzfeld, Klupp, Loudon u. Zweymüller). Aber auch bei gleicher, langsamer Infusionsgeschwindigkeit ergaben sich von Versuch zu Versuch deutliche Abweichungen der — innerhalb einzelner Experimente stabilen — Rückresorption, die der Annahme eines individuell konstanten tubulären Maximums widersprechen. Es hat danach eher den Anschein, als ob die Rückresorptionsgröße aus bisher unbekannten Ursachen spontan variieren könne. Auch Thompson u. Hiatt haben kürzlich beträchtliche Veränderungen der maximalen Rückresorption vor allem nach wiederholter täglicher Infusion größerer Orthophosphatmengen am Menschen beobachtet. Dieser Befund kann jedoch nicht zur Erklärung der von uns beobachteten Schwankungen der Reabsorption bei gleicher Infusionsgeschwindigkeit herangezogen werden, da zwischen unseren einzelnen Versuchen eine Zeitspanne von mindestens 7 Tagen lag. Es kommt noch hinzu, daß die Einschaltung längerer Intervalle unsere Ergebnisse nicht beeinflußte.

Neben derartigen Abweichungen bei gleicher Versuchsanordnung kamen auch noch bedeutende Schwankungen der Reabsorption im selben Versuch vor, und zwar bei Phosphatbelastungen, die nach den Ergebnissen mit langsamer Infusionsgeschwindigkeit schon zur Sättigung der Tubuli und daher zu konstanten Rückresorptionswerten hätten führen müssen. Dabei wurden bei allen Tieren Zusammenhänge zwischen Rückresorptionsgröße und Infusionsgeschwindigkeit beobachtet, die nicht mehr zufällig sein können, wahrscheinlich auch nicht durch den toten Raum der Nieren und sicher nicht durch Schwankungen der Filtrationsgröße bedingt sind. Die beobachteten Abweichungen sind auch nicht mit der von Hogben u. Bollmann beschriebenen Ermüdung des Rückresorptionsmechanismus nach längerdauernder Phosphatbelastung identisch: Die Infusionsgeschwindigkeit war für unsere Rückresorptionswerte von größerer Bedeutung als die Dauer der Phosphatinfusion; selbst nach längerer Versuchsdauer führte eine Erhöhung der Infusionsgeschwindigkeit zu deutlichen Steigerungen der Rückresorption über die bei langsamer Infusion beobachteten relativ stabilen Werte hinaus.

Die von der Infusionsgeschwindigkeit abhängigen, für ein Tier in Abb. 3 zusammengestellten Schwankungen lassen es trotz des beschränkten Vergleichsmaterials von drei Tieren fraglich erscheinen, ob man beim Hund ohne weitere Untersuchungen bzw. genaue Definition der jeweiligen Infusionsgeschwindigkeit überhaupt von einer maximalen Begrenzung der Phosphatresorption sprechen soll. Es ergeben sich sogar gewisse Ähnlichkeiten mit der Phosphatausscheidung bei Katzen, wo

die Rückresorption nicht beschränkt ist, sondern kontinuierlich mit dem Plasmaspiegel zunimmt (Eggleton u. Habib, Taugner, v. Bubnoff u. Braun). Diese neuen Gesichtspunkte wären wohl auch bei allen Studien zu berücksichtigen, die sich mit experimentellen Veränderungen der Phosphatrückresorption — z. B. durch Parathormon oder Vitamin D — befassen und den Begriff eines Tm P benützen.

Zur Erklärung des Zusammenhangs zwischen Infusionsgeschwindigkeit und Phosphatrückresorption könnte angenommen werden, daß es sich um entsprechende Variationen der resorptiven Tubulusleistung handelt. Diese würden durch direkte Einflüsse der Phosphatangebots oder indirekt, über extrarenale Regulationsmechanismen zustande kommen, die vielleicht in Abhängigkeit von der Infusionsgeschwindigkeit mit verschiedener Intensität in Gang gesetzt werden. Für die 1. Annahme liegen keinerlei Anhaltspunkte vor. Extrarenale Faktoren werden von Thompson u. Hiatt zur Erklärung der Beobachtung angewandt, daß vorhergehende Phosphatzufuhr die Rückresorptionsgröße beim Menschen für längere Zeit vermindert. Die bisher bekannten Einflüsse auf die Rückresorptionskapazität sind jedoch zur Deutung der von uns beobachteten Abweichungen bei verschiedener Infusionsgeschwindigkeit, aber auch bei von Versuch zu Versuch gleichbleibenden Bedingungen zu gering. Dies trifft zu für Aminosäuren und Glucose (Pitts u. Alexander, Ayer, Schiess u. Pitts), Natrium und Kalium (Hogben u. Bollmann), sowie Vitamin D und Nebenschilddrüsenhormon* (Harrison u. Harrison, Fay, Behrmann u. Buck, Jahan u. Pitts, Hogben u. Bollmann, Cargill u. Witham, Herzfeld u. Mitarb.). Die aufgezählten Faktoren dürften in unseren Versuchen auch weitgehend konstant gewesen sein. Man müßte daher Veränderungen der Tubulustätigkeit aus bisher gänzlich unbekannten Ursachen annehmen.

Bei allen diesen Überlegungen ist schließlich zu bedenken, daß die Phosphatrückresorption nur eine rechnerische Größe darstellt, die sich aus der Differenz zwischen filtriertem und ausgeschiedenem Phosphat ergibt. Die Kenntnis der Phosphatfiltrierbarkeit ist daher für die Beurteilung der Rückresorption von entscheidender Bedeutung. Wir setzten, wie bisher üblich, bei allen Berechnungen vollständige Filtrierbarkeit des anorganischen Plasmaphosphats voraus. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die errechneten Veränderungen der Rückresorption nur scheinbar und durch Variationen der Phosphatfiltrierbarkeit bedingt sind.

Derartige, die Beurteilung der Phosphatrückresorption komplizierende Einflüsse von Seiten des erstmals von Eichholtz u. Starling beschriebenen, nichtfiltrierbaren Calcium-Phosphat-Komplexes sind wiederholt vermutet worden (Literatur siehe bei Lambert u. Mitarb., Taugner u. Mitarb., Schmid u. Mitarb.). Harrison u. Harrison z. B. führten ihre Clearance-Bestimmungen erst 60—90 min nach Beendigung der Phosphatzufuhr durch, da der Komplex zu diesem Zeitpunkt schon aus dem Plasma verschwunden sein soll. Lambert u. Mitarb., deren Ergebnisse bei fallenden Plasmakonzentrationen am Menschen weitgehend mit unseren bei kontinuierlicher Infusion an Hunden übereinstimmen,

* Thompson u. Hiatt haben über Einflüsse des Parathormons auf die Tm P kürzlich allerdings weitere Belege gesammelt.

haben durch die vergleichende Vornahme von Ultrafiltrations- und Clearance-Bestimmungen das Vorliegen eines nichtfiltrierbaren Ca-P-Komplexes sehr wahrscheinlich gemacht. Nach unseren Ergebnissen würde die Menge des entstehenden nichtfiltrierbaren Phosphates u. a. von der Infusionsgeschwindigkeit und nicht nur, wie früher angenommen, von der Konzentration des P und Ca im Plasma abhängen. LAMBERT hatte schon die Möglichkeit diskutiert, daß bei rascher Zufuhr von Orthophosphat beträchtliche Mengen nichtfiltrierbarer Phosphate entstehen und so eine höhere Rückresorption vortäuschen könnten; bei langsamer und gleichmäßiger Steigerung der Phosphatkonzentration dagegen würde das nichtfiltrierbare Phosphat möglicherweise konstant und damit unbemerkt bleiben.

Eigenartigerweise wird die modifizierende Rolle kolloidaler Ca-P-Komplexe bei Orthophosphat nur selten, bei der Calcium-Ausscheidung dagegen allgemein berücksichtigt. Es wird geradezu betont, daß unsere Kenntnisse über die renalen Ausscheidungsmechanismen von Calcium noch völlig unzureichend sind, da die Beurteilung des physikalisch-chemischen Zustandes und daher der Glomerulusfiltration angesichts der mangelhaften Methoden zur Bestimmung der Ultrafiltrierbarkeit in vitro unzuverlässig sei. Für Calcium sind daher ernsthafte Versuche zur Bestimmung der Rückresorptionsgröße noch gar nicht durchgeführt worden (vgl. H. W. SMITH). Die endgültige Beurteilung der Phosphatfiltrierbarkeit und damit der Phosphatrückresorption sollte aber wohl ebenfalls erst nach weiteren Bemühungen um die Bestimmung der Ultrafiltrierbarkeit unter möglichst weitgehender Annäherung an die physiologischen Verhältnisse versucht werden. Bei den bisherigen Ultrafiltrationsversuchen wurde unseres Erachtens die Porengröße der Membran hinsichtlich einer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Glomerulusfiltration nicht gebührend berücksichtigt.

Zusammenfassung

An drei trainierten Hunden ergaben sich nur in bestimmten Versuchen bei langsamer Orthophosphatinfusion Hinweise auf eine — der herrschenden Ansicht entsprechende — Begrenzung der Rückresorptionskapazität. Das „tubuläre Maximum" für Orthophosphat lag dabei jedoch im Bereich wesentlich höherer Plasmaspiegel als bisher angenommen. In einer Reihe von Versuchen mit größerer Infusionsgeschwindigkeit war dagegen keine Begrenzung der Rückresorption zu ermitteln. Die Größe der Rückresorption variierte schließlich — auch bei gleicher Infusionsgeschwindigkeit — in den einzelnen Versuchen am selben Tier. Es erscheint daher fraglich, ob man beim Hund ohne weitere Untersuchungen bzw. genaue Definition der jeweiligen Infusionsgeschwindigkeit die Annahme einer maximalen Begrenzung der Phosphatrückresorption akzeptieren soll.

Die Phosphatresorption ist eine nicht direkt bestimmbare, rechnerische Größe. Schwankungen der errechneten Rückresorptionswerte können zwar tatsächliche Variationen der Tubulustätigkeit darstellen; es kann sich aber auch um Schwankungen der Phosphatfiltrierbarkeit handeln.

Literatur

Ayer, J. L., W. A. Schiess and R. F. Pitts: Amer. J. Physiol. **151**, 168 (1947). — Cargill, W. H., and A. C. Witham: Federat. Proc. **8**, 21 (1949). — Eggleton, M. G., and J. A. Habib: J. of Physiol. **111**, 423 (1950). — Eichholtz, F., and E. H. Starling: Proc. Roy. Soc. (Lond.) **99**, 91 (1925). — Fay, M., V. G. Behrmann and D. M. Buck: Amer. J. Physiol. **136**, 716 (1942). — Fiske, C. H., and Y. Subbarow: J. of Biol. Chem. **66**, 376 (1925). — Harrison, H. E., and H. C. Harrison: J. Clin. Invest. **20**, 740 (1941). — Herzfeld, E., H. Klupp, M. Loudon u. E. Zweymüller: Z. exper. Med. **126**, 33 (1955). — Hogben, C. A. M., and J. L. Bollmann: Amer. J. Physiol. **164**, 662 (1951). — Jahan, J., and R. F. Pitts: Amer. J. Physiol. **155**, 42 (1948). — Lambert, P. P., E. van Kessel u. C. Leplat: Acta med. scand. (Stockh.) **128**, 386 (1947). — Lieb, H., u. M. K. Zacherl: Z. physiol. Chem. **223**, 169 (1934). — Pitts, R. F., and R. S. Alexander: Amer. J. Physiol. **142**, 648 (1944). — Schmid, E., H. Ganz, W. Braun u. R. Taugner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 452 (1955). — Thompson, D. D., and H. Hiatt: Persönliche Mitteilung. — Taugner, R., M. v. Bubnoff u. W. Braun: Pflügers Arch. **258**, 133 (1953). — Taugner, R., M. v. Bubnoff, H. Hochrein, F. Dorschner u. E. Schmid: in Vorbereitung.

Dr. R. Taugner, Heidelberg, Pharmakol. Institut d. Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 253—257 (1956)

Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät der Karls-Universität in Prag, Zweigstelle Pilsen (Vorstand: Dozent Dr. Adolf Zelený)

Zur Frage des Einflusses von Chloropromacin auf den Blutzucker

Von

V. Lindaur*

(Eingegangen am 11. Mai 1956)

Bereits während der ersten experimentellen Arbeiten, bei denen Chloropromacin (auch „Megaphen", „Largactil", „Aminasin") angewandt wurde, zeigte es sich, daß dieses Arzneimittel, welches in die Stoffwechselvorgänge eingreift, auch den Blutzuckerspiegel beeinflußt. V. Wynn macht 1954 darauf aufmerksam, daß die Glucose unter dem Einfluß von Chloropromacin langsamer umgesetzt wird. Mundeleer (1953), Charatan u. Bartelett (1955) und andere beweisen, daß die artifizielle Hibernation die Hyperglykämie verhindern kann und die Toleranz des Organismus für Glucose erhöht. Bamdas, Glod, Lando, Levkovič, Tarasov u. Chazen, beschreiben 1956 eine Entstehung von Hyperglykämie, welche der Dosis von Chloropromacin entspricht. Bemerkenswert sind auch die Arbeiten, welche den Einfluß von Choropromacin auf Insulin behandeln. Bamdas u. Mitarb. beweisen, daß 25 mg/kg Aminacin die Wirkung des Insulins blockiert oder verzögert. Ähnliche Ergebnisse erzielen auch Giaja, Marković-Giaja, Pavlović (1955). Zillinger versuchte (1955) an Patienten die Kombination von Megaphen und Insulin und stellte bei 16 Fällen nach 25 mg Megaphen eine Erhöhung des Insulins (d. h. eine kräftige Senkung des Blutzuckerspiegels) fest. Im Gegensatz dazu bemerkte er bei 9 Fällen eine Abschwächung der Insulinwirkung. Das Verhältnis des Chloropromacins zum Alloxan-Diabetes behandeln Sobrinho u. Osswald (1955): 20 mg kg Chloropromacin 15 min vor der Verabreichung von Alloxan eingespritzt, verhindern die Entstehung des Alloxan-Diabetes. Ähnliche Resultate erzielte jedoch Martinez (1955) auch mit Barbitursäure anstatt Chloropromacin. Bei allen diesen Versuchen an Tieren verwendete man die sogenannten „physiologischen Dosen" von Chloropromacin, nämlich 10—50 mg je Kilogramm Körpergewicht. Wir stellten uns die Frage, wie auf die Regulation des Blutzuckers die Mengen wirken werden, welche man laufend in der Therapie

* Mit dankbarer Anerkennung der technischen Mitarbeit von J. Klausvicová und J. Dvorská (techn. Assistentinnen) und M. Bakalová (Sekretärin des physiolog. Instituts), für ihren Beitrag bei der Übersetzung der Arbeit.

verwendet, d. h. 0,25—1 mg je Kilogramm. Da die Interpretation des eigentlichen Einflusses von Chloropromacin auf den Blutzuckerspiegel bei den verschiedenen Autoren bedeutende Unterschiede aufweist, bemühten wir uns weiter, die Fragen zu beantworten, wie das Chloropromacin in kleinen Dosen die Resorption und Auswertung der Glucose beeinflußt und welches seine Beziehung zum Insulin ist.

Methodik

Bei den Experimenten wurden erwachsene Kaninchen in Gruppen von 10 Stück, ungefähr gleichen Gewichtes, verwendet, welche 12 Std vor dem Versuche nüchtern gehalten wurden. Es wurde eine 40%ige wäßrige Lösung von Glucose entweder in der Menge von 1 g je Kilogramm i.v. eingespritzt oder in der Dosis von 2 g je Kilogramm mittels einer Sonde per os appliziert. Das Chloropromacin (Largactil für Injektionen i.v. — in Ampullen zu 50 mg) wurde in Dosen von 0,25—1 mg/kg eingespritzt. Das Insulin-NOVO wurde i.v. in Mengen von 0,5—1 UI/kg appliziert. In Zeitabständen wurde der Blutzuckerspiegel nach Hagedorn-Jensen bestimmt.

Versuche

In der ersten Reihe der Versuche bemühten wir uns festzustellen, wie das Chloropromacin die Geschwindigkeit der Resorption von Glucose beeinflußt. An Kontroll-Kaninchen ergaben sich nach oraler Gabe von je

Tabelle 1

Zeit in min	Erhöht um %	Anzahl der Fälle	Mittlere Abweichung
30	41	10	2,01
60	38,5	10	2,8
90	39	10	3,8
120	37	10	3,6
180	12,5	8	3,1

Tabelle 2

Zeit in min	Erhöht um %	Anzahl der Fälle	Mittlere Abweichung
30	18	10	1,0
60	27	10	3,0
90	23	8	3,0
120	25	8	1,6
180	25	7	2,3

5 ml 40%iger Glucoselösung je Kilogramm folgende Werte, wobei die Erhöhung gegenüber der Ausgangslage des Glucosespiegels in Prozenten ausgedrückt ist.

Nach Feststellung der Normalwerte begannen wir bei 10 weiteren Tieren mit der Applikation von 0,5 mg Largactil je Kilogramm i.v. 1 Std vor der oralen Verabreichung der Glucose. Die Resultate sind in nachstehender Tab. 2 angeführt.

Aus dem Vergleich dieser 2 Tabellen resultiert, daß sich nach Verabreichung von Chloropromacin die Resorption der Glucose bedeutend verzögert. Der Glucosespiegel erreicht nach der Applizierung von Largactil nie die Höhe wie bei den Kontrolltieren, bleibt jedoch längere Zeit hindurch erhöht.

In der darauffolgenden Serie von Versuchen verfolgten wir das Verhalten der Glucose nach i.v. Einspritzung. Die Kontroll-Kaninchen

erhielten 2,5 ml 40%iger Glucoselösung je 1 kg. Die perzentuelle Erhöhung des Blutzuckerspiegels gibt nachstehende Tabelle an.

Tabelle 3

Zeit in min	Erhöht um %	Anzahl der Fälle	Mittlere Abweichung
15	68	10	6,1
30	46,6	10	5,5
60	27,7	9	2,2
90	Rückkehr zu den Ausgangswerten, eventuelle leichte Senkung unter diese Werte; nur bei 1 Fall noch eine Erhöhung um 7%		

Nach 0,25 mg je Kilogramm Chloropromacin i.v. 60 min vor Verabreichung der Glucose ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 4

Zeit in min	Erhöhung um %	Anzahl der Fälle	Mittlere Abweichung
15	119	10	9,8
30	88	10	7,4
60	47	10	6,3
90	21	9	3,0
120	Rückkehr zur Norm		

Die i.v. eingeführte Glucose erreicht bei weitem höhere Werte nach Largactil als bei den Kontrolltieren, und dieser hohe Blutzuckerwert bleibt längere Zeit erhalten.

In der letzten Serie der Versuche wollten wir uns überzeugen, ob das Largactil direkt und inwieweit die Wirkung des Insulins beeinflußt. Die Tiere erhielten zuerst 1 mg je Kilogramm Largactil und 1 Std später wieder i.v. 0,5 UI je Kilogramm. Chloropromacin allein wirkt in dieser geringen Menge auf den Glucosespiegel 1 Std nach der Einspritzung nur wenig (vgl. Tab. 5).

Tabelle 5

	Blutzuckerspiegel mg-%	Anzahl der Fälle	Mittlere Abweichung mg-%
Vor der Verabreichung von Chloropromacin . .	119	10	7,5
60 min nach Verabreichung des Chloropromacins . .	126	10	8,6

An Kontrolltieren bewirkte Insulin eine Maximalsenkung des Blutzuckerspiegels um 38,7% ± 5,8%. Bei den Versuchstieren, die 1 Std vor derselben Menge von Insulin 1 mg/kg Largactil erhalten hatten, erfolgte eine Maximalsenkung um 42,6% ± 6,25%.

Es ist klar, daß dieser unbedeutende Unterschied gegen eine direkte Einwirkung auf das Insulin spricht.

Diskussion

Wir glauben also festgestellt zu haben:

1. Das Largactil verzögert die Resorption oral gegebener Glucose.

2. Das verursacht ein Zurückhalten von i.v. applizierter Glucose im Blute und verzögert ihr Eindringen in die Gewebe und ihre weitere Umsetzung.

3. Die von uns verabreichte Menge Largactil erhöht den Blutzuckerspiegel nur unbedeutend.

4. In der Kombination mit Largactil ändert sich die Wirksamkeit des Insulins fast nicht.

Die ersten zwei Punkte decken sich vollkommen mit Wynns Arbeit aus dem Jahre 1954, nach der die Glucose nach Verabreichung von Largactil langsamer umgesetzt wird. Daß die Glucoseresorption aus dem Darm ins Blut, besonders bei Chloropromacin in Erscheinung tritt, erklärt sich aus seiner Zugehörigkeit zu den Ganglioplegica, also Stoffen, welche das vegetative Nervensystem stark beeinflussen.

Auf enge Beziehungen zwischen Chloropromacin und Hypothalamus weisen viele Autoren hin (Bamdas u. Mitarb.). Diese Veränderungen wirken sich auch an der Peripherie durch die Änderung des vegetativen Tonus aus, was wiederum notwendigerweise mit der Beeinflussung des Kreislaufes und des Metabolismus eng zusammenhängt (Zillinger 1954 u. a.). Nach der Verabreichung von Chloropromacin tritt eine Senkung des Blutdruckes ein, die Pulsfrequenz wird verzögert, wodurch es wiederum zwangsweise zur Verringerung der Durchblutung kommt. Bamdas u. Mitarb. beobachteten nach der Applikation von Aminasin eine Verlangsamung der Blutströmung in den Darmschlingen, welche auch mit einer teilweisen Venostase verbunden war. Auch eine Herabsetzung des Stoffwechsels tritt ein. Nach unseren Messungen senkt die Dosis 10 mg/kg Ratte die CO_2-Abgabe durchschnittlich um 40%.

Die Feststellung, daß der Glucosespiegel sich nach i.v. Einspritzung lange Zeit hindurch recht hoch erhält, läßt sich dadurch erklären, daß nach der Applikation von Largactil die Phosphorilation herabgesetzt wird.

Dies beweisen Beobachtungen von Grenell, Mendelsohn, McElroy (1955), nach denen im Gehirn das ATP proportionell zu der Menge des verabreichten Largactils zunimmt, daß also der Zerfall von ATP verzögert und zwangsläufig die Phosphorilation herabgesetzt wird. Für die Synthese des Glykogens ist die toxische Wirkung des Chloropromacins auf das Leberparenchym bei chronischer Verabreichung bedeutsam; denn wahrscheinlich kann hier auch die akute Applikation des Chloropromacins zur Geltung gelangen. Zu der schwachen hyperglykämischen Wirkung des Chloropromacins, sind Bamdas u. Mitarb. der Meinung, daß das Aminasin (Chloropromacin) die Aktivität des Insulins herabsetzt und seine Wirkung verzögert. Ich führe ihre Tabelle an:

Tabelle 6

	0	10 min	20 min	30 min	1 Std	2 Std	3 Std	4 Std
Insulin 2 UI . . .	90	89	76	63	47	34	29	27
Insulin 2 UI + Aminasin 25 mg/1 kg . . .	100	111	106	104	94	83	79	60

Diese Werte können jedoch nur erzielt werden, wenn Insulin subcutan verabreicht wird, jedoch nicht bei intravenöser Einspritzung. Der eigentliche Effekt, den das Chloropromacin verursacht hat, ist die Verzögerung der Insulinresorption, hervorgerufen durch geringere Durchblutung. In gewissem Zusammenhang mit diesen Tatsachen stehen auch die Beobachtungen S. Sobrinhos u. Mitarb., welche die schützende Wirkung des Largactils gegen die Entstehung des Alloxan-Diabetes zeigen. Die Wirkung des Chloropromacins ist hier nämlich wiederum nicht spezifisch, da, wie Martinez 1955 bewies, auch durch rechtzeitige Verabreichung von Barbituraten die Entstehung des Alloxan-Diabetes verhindert werden kann.

Zusammenfassung

Das Chloropromacin beeinflußt den Blutzuckerspiegel. Die glykämische Kurve wird beim Kaninchen abgeflacht und verlängert, nachdem per os Glucose verabreicht wurde. Das Chloropromacin verursacht die Zurückhaltung der i.v. eingespritzten Glucose im Blute, verzögert ihren Übertritt in die Gewebe und die darauffolgende Umsetzung. Eine hyperglykämische Wirkung des Chloropromacins selbst wurde beobachtet, ist jedoch unbedeutend. Die direkte Einwirkung des Chloropromacins auf die Aktivität des Insulins konnte gleichfalls nicht nachgewiesen werden, wenn das Insulin i.v. zugeführt wurde. Die durch das Chloropromacin am Blutzucker hervorgerufenen Veränderungen können nicht durch eine Einwirkung auf das Insulin erklärt werden, sie sind vielmehr der Wirkung des Chloropromacins auf das Nervensystem, die Blutzirkulation und den Stoffwechsel zuzuschreiben.

Literatur

Bamdas, B. S., G. D. Glod, L. I. Lando, A. P. Levkovič, G. K. Tarasov u. I. N. Chazen: Žurnál nĕvropatologii i psichiatrii, imeni Korsakova, Tom **56**, 121—138 (1956) Moskva. — Fleckenstein, A.: Berichte über die gesamte Physiologie u. experimentelle Pathologie **172**, 144 (1955). — Giaja, J., L. Markovič-Giaja u. V. Pavlovvič: Arch. internat. Physiol. **83**, Fasc. 3, 413–421 (1955). — Grenell, Mendelsohn and McElroy: A. M. A. Arch. of Neur. **73**, 341—346 (1955). — Charatan, F. B. E., and N. G. Bartelett: J. Ment. Sci. **101**, 351—353 (1955). — Martinez, C.: Amer. J. Physiol. **182**, Nr. 2, 267—268 (1955). — Mundeleer, P.: Anesthesiology **10**, 448 (1953). — Sobrinho, S., and W. Osswald: Metabolism, Clin., and Exptl., **4**, 333—336 (1955). — Wynn, V.: Lancet **1954**, 575. — Zillinger, G.: Ärztl. Forsch. **1954**, I/124.

Dr. V. Lindaur, Physiolog. Institut d. med. Fakultät d. Karls-Universität, Pilsen/ČSR

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 258—271 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Der Antagonismus von Parasympathicolytica gegenüber der elektrischen Vagusreizung am Hundedarm*

Von

D. Krause und Dorothee Schmidtke-Ruhnau

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. April 1956)

Der *Antagonismus des Atropins gegenüber einer Vaguserregung* am Darm ist ein *umstrittenes Problem.* Die von Bayliss u. Starling[2] sowie Cushny[3] und neuerdings von Vogt[21] und Wick[22] festgestellte Atropinresistenz des Darmes gegenüber der elektrischen Vagusreizung hat zu Zweifeln an der cholinergischen Natur der postganglionären parasympathischen Fasern im Darm geführt. Im Widerspruch zu den genannten Autoren stehen die Befunde von Straub[20] am Meerschweinchendarm, von Greeff u. Holtz[7, 8] am Magen-Vagus-Präparat und von Harrison u. McSwiney[9] am Katzenmagen. Hiernach ist der Effekt der Vagusreizung durch Atropin auszulöschen. Da die vorhandenen Widersprüche einwandfreie Rückschlüsse nicht zulassen, haben wir das Problem der parasympathicolytischen Wirkung am Hundedarm einer Neubearbeitung unterzogen.

Für die praktische Therapie von Spasmen des Magen-Darm-Kanals gewinnen neuerdings *synthetische Spasmolytica,* die sich vom Atropin durch ihre kürzere Wirkungsdauer und geringere Nebenwirkungen unterscheiden, an Bedeutung. Aus diesem Grunde haben wir neben dem Atropin auch das *Buscopan* (Hyoscin-N-butylbromid)[22] und das *Epidosin* (Phenylmethylvaleriansäure-β-diäthylaminoäthylester-brommethylat)[14] in die Untersuchung einbezogen.

In bezug auf die Nomenklatur verweisen wir auf frühere Veröffentlichungen[13, 14]. Es erscheint sinnvoll, für die Beschreibung der Wirkung von Parasympathicolytica die Definitionen „*cholinolytisch*" und „*parasympathicolytisch*" einzuführen. Als „cholinolytische" Wirkung wird der Antagonismus gegenüber humoral zugeführtem (injiziertem bzw. der Badflüssigkeit zugesetztem) Acetylcholin oder Carbaminoylcholin bezeichnet, während der Ausdruck „parasympathicolytische" Wirkung für den Antagonismus gegenüber dem elektrischen Vagusreiz gebraucht wird. — Eine ähnliche Differenzierung ist bei den Sympathicolytica seit längerem üblich. Bedauerlich ist die Tatsache, daß bei der Untersuchung parasympathicolytischer Effekte eine postganglionäre Reizung nicht möglich ist, so daß auch ganglioplegische Wirkungskomponenten interferieren können.

* Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auf der 22. Tagung der Pharmakologischen Gesellschaft in Graz kurz vorgetragen [Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 194 (1956)].

Methodik

Die Versuche wurden an Hunden durchgeführt. Zur Narkose diente Chloralose in einer Dosierung von 0,08—0,12 g/kg i.v. In allen Versuchen wurde der arterielle *Blutdruck* mit einem Hg-Manometer aus der Art. carotis und die *Darmbewegungen* mit einer Ballonsonde (Kondomgummi) und einem Wassermanometer aus dem Duodenum registriert. Der auf dem Darm lastende Füllungsdruck wurde so eingestellt, daß die spontane Peristaltik möglichst geringfügig war. Um die Notwendigkeit von Unterbindungen und Schnitten am Darm zu umgehen, wurde die Ballonsonde durch den Oesophagus und den Magen hindurchgeführt; die Leitung der Sonde und die Kontrolle ihres Sitzes erfolgte manuell durch eine Laparotomiewunde. In 9 Versuchen an sehr großen Hunden wurde die Sonde ohne Laparotomie eingeführt und der richtige Sitz erst nach Abschluß des Versuches durch Inspektion kontrolliert; da diese Versuche sich im Ergebnis von denen mit Laparotomie nicht unterschieden, wurden sie in die allgemeine Auswertung mit einbezogen. In insgesamt 14 Versuchen registrierten wir neben dem Blutdruck die Herzfrequenz mit einem Zeitordinatenschreiber in einer schon früher beschriebenen Anordnung[15]. Hunde, die nach der Vagotomie zu einer ausgesprochen langsamen und sehr tiefen Atmung übergingen, wurden mit einer STARLING-Pumpe oder einer DALE-SCHUSTER-Pumpe künstlich beatmet.

Bei der elektrischen Vagusreizung wurde auf die Anwendung höherer Reizfrequenzen und einer kurzen Reizdauer verzichtet, da frühere Untersuchungen mit dieser Methodik bereits gezeigt hatten, daß einwandfrei reproduzierbare und auswertungsfähige Erfolge auf diese Weise nicht zu erzielen sind. Wir haben deshalb in Anlehnung an das von LENDLE, MERCKER u. ROHR[16] beschriebene Verfahren mit länger dauernder Reizung der beiden peripheren Vagusstümpfe am Hals gearbeitet. Als Reizgerät diente der Megatest (Medeor). Die Reizung erfolgte mit einer Frequenz von 2—3 rechteckförmigen Impulsen pro Sekunde, die Reizintensität und die Impulsdauer wurden so eingestellt, daß bei einer Reizdauer von 2 bis 5 min ein einwandfreier und sicher reproduzierbarer Effekt am Darm und am Blutdruck zu erzielen war. Eine Impulsdauer unter 5 msec führte am Darm nur selten zu einwandfreien Wirkungen, während am Blutdruck schon eine Impulsdauer von 0,1—0,2 msec ausreichend war. Wir haben deshalb in jedem Experiment zunächst den Versuch gemacht, bei einer Impulsdauer von 5 msec die Reizintensität innerhalb einer Spanne von 5—20 Milliamp. so einzustellen, daß mit Sicherheit ein supermaximaler Effekt erzielt wurde. Wenn mit 5 msec und 20 Milliamp. noch keine auswertungsfähige Wirkung zu erzielen war, wurde die Impulsdauer auf 10 msec verlängert; hiernach zeigte sich im Regelfall auch am Darm ein guter Reizerfolg, die Reizintensität konnte dann sogar noch vermindert werden. Versuchstiere, deren Darm auch bei einer Impulsdauer von 10 msec und einer Reizintensität von 20 Milliamp. nicht einwandfrei reagierte, lieferten auch bei weiterer Verlängerung der Impulsdauer bis zur Nervenschädigung keine reproduzierbaren Ergebnisse. Insgesamt erwiesen sich 11 Hunde als „unbrauchbar".

Um eine brauchbare Vergleichsgrundlage zu erhalten, wurde außer der parasympathicolytischen Wirkung auch die cholinolytische Wirkung der 3 Parasympathicolytica untersucht. Als Testsubstanz diente hierbei Doryl (Carbaminoylcholinchlorid), das in einer Dosis von 2 γ/kg i.v. injiziert wurde; Acetylcholin erwies sich als ungeeignet, weil eine Darmwirkung nur mit sehr hohen toxischen Dosierungen unsicher zu erhalten war. Die Untersuchung der cholinolytischen Wirkung erfolgte im allgemeinen getrennt von der Untersuchung des parasymathicolytischen Effektes; an 14 Hunden wurden jedoch beide Prüfungen parallel durchgeführt.

Zwischen dem Abschluß des operativen Eingriffs und der Einstellung und Überprüfung der Testreize lag eine Wartezeit von 1 Std. Die Parasympathicolytica

wurden erst dann appliziert, wenn die Reproduzierbarkeit der Testreize gesichert war. Die erste Prüfung auf eine evtl. Veränderung der Testreize erfolgte 3—4 min nach Injektion des Lyticums, wenn ein stationärer Zustand erreicht war. In den Versuchen, in denen sowohl eine Prüfung der parasympathicolytischen als auch der cholinolytischen Wirkung durchgeführt wurde, erfolgte die Dorylinjektion nach dem Vagusreiz.

Da eine einwandfreie quantitative Bewertung des Effektes der Vagusreizung am Darm wegen der Form der Kurven fast unmöglich erschien, wurde die Auswertung qualitativ mit Hilfe der Methodik von Litchfield u. Wilcoxon[18,19] vorgenommen. Als „positiv" wurden grundsätzlich nur diejenigen Versuche gewertet, bei denen nach Injektion des Lyticums ein sichtbarer Effekt der Vagusreizung in der „Kurve" nicht mehr festzustellen war. Am Darm dürfte diese Methode kaum mit einem wesentlichen Fehler behaftet sein; bei der Bewertung der am Kreislauf erzielten Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß eine mäßige Reduktion der Pulsfrequenz beim Hund in Chloralose-Narkose nicht zu einer bewertbaren Veränderung der Kurve des arteriellen Mitteldruckes führt. Im allgemeinen registriert das Quecksilbermanometer bei intakter Kreislaufregulation nur solche Veränderungen der Pulsfrequenz, bei denen eine Reduktion um mindestens 40% des Ausgangswertes erfolgt. Die am Kreislauf erhaltenen Resultate über die wirksamen Dosierungen der Parasympathicolytica dürften dementsprechend zu niedrig sein.

Von den 3 Parasympathicolytica wurden je 4—5 Dosierungen mit 8—17 Einzelversuchen pro dosi eingesetzt; besonderer Wert wurde auf die Dosierungen gelegt, die zwischen den Erwartungswerten der ED_{16} und der ED_{84} lagen. Um eine Verfälschung und künstliche Reduktion der Streuung zu vermeiden, wurde, wenn einem einzelnen Versuchshund mehrere Dosierungen eines Pharmakons verabfolgt waren, nur die jeweils erste Dosis in die Auswertung einbezogen.

Da die Wirkungsdauer der 3 untersuchten Parasympathicolytica recht verschieden war, wurde die vergleichende statistische Auswertung „zeitlos" durchgeführt, indem der jeweils erste Reiz nach Applikation des Lyticums bewertet wurde. Die Berechnung der Wirkungsdauer erfolgte durch Bestimmung der Zeit bis zur vollständigen Wiederherstellung des Effektes der Vagusreizung am Darm.

Ergebnisse

1. Testreize

Die *Vagusreizung* führte in 93% ($\sigma = \pm 2{,}7\%$) der Versuche zu einer über 5—8 Std *gut reproduzierbaren Förderung der Darmtätigkeit.* Diese dokumentiert sich in einem Tonusanstieg sowie einer mehr oder weniger ausgeprägten Steigerung der Amplitude der einzelnen Kontraktionen; gelegentlich kam es auch zu einer Frequenzsteigerung. Spasmen wurden in keinem Falle registriert; nur gelegentlich erschien die durch Vagusreizung ausgelöste Darmerregung unkoordiniert. — Die Latenzzeit bis zum Eintritt der Wirkung beträgt am Darm 30—90 sec, sie ist also wesentlich länger als am Kreislauf. Der Gipfelwert der Darmerregung wurde bei 25% der Versuche fast direkt nach Einsetzen des Reizerfolges beobachtet, in den übrigen Versuchen 1—2 min später. Bei länger dauernden Reizen ging die Darmerregung allmählich zurück, blieb jedoch auch bei langdauernder Reizung (bis zu 1 Std) über dem Ausgangswert.

Der Effekt der als Testreiz verwandten i.v. Injektion von Doryl entsprach den in der Literatur[14, 17] niedergelegten Angaben. — Kontrollversuche, bei denen neben den Darmbewegungen der intraabdominale Druck registriert wurde, zeigten, daß der intraabdominale Druck während der Testreize praktisch unverändert blieb.

2. Parasympathicolytica

Die Wirkung der beschriebenen Testreize konnte durch die untersuchten Parasympathicolytica in wechselndem Umfang *abgeschwächt oder aufgehoben* werden. Das Maximum des parasympathicolytischen bzw.

Tabelle 1. *Mittlere wirksame Dosierungen* (mit 95% Sicherheitsgrenzen)

	Antagonismus gegen elektrischen Vagusreiz		Antagonismus gegen Doryl (2 γ/kg i.v.)	
	Darm	Blutdruck	Blutdruck	Darm
Atropin .	26,5 γ/kg (14,72—47,7)	9,5 γ/kg (6,33—14,25)	2,85 γ/kg (2,37—3,42)	3,75 γ/kg (3,02—4,65)
Epidosin	40,0 γ/kg (23,5—68,0)	23,5 γ/kg (14,69—37,6)	3,71 γ/kg (2,99—4,6)	3,71 γ/kg (2,99—4,6)
Buscopan	40,0 γ/kg (24,24—66,0)	118,0 γ/kg (80—175)	50 γ/kg unwirksam; 100 γ/kg in 8 von 10 Versuchen wirksam	50 γ/kg unwirksam; 100 γ/kg in 8 von 10 Versuchen wirksam

Tabelle 2. *Wirkungsverhältnisse auf der Basis der ED_{50}* (mit 95% Sicherheitsgrenzen)

1. $PR = \frac{\text{Atropin (Vagusreiz, Darm)}}{\text{Atropin (Doryl, Darm)}}$ = 7,1 (3,37—11,8)
2. $PR = \frac{\text{Epidosin (Vagusreiz, Darm)}}{\text{Epidosin (Doryl, Darm)}}$ = 10,8 (6,15—19,0)
3. $PR = \frac{\text{Epidosin}}{\text{Atropin}}$ (Vagusreiz, Darm) = 1,51 (0,685—3,32)
4. $PR = \frac{\text{Buscopan}}{\text{Atropin}}$ (Vagusreiz, Darm) = 1,51 (0,7—3,26)
5. $PR = \frac{\text{Buscopan}}{\text{Epidosin}}$ (Vagusreiz, Darm) = 1,0 (0,49—2,05)
6. $PR = \frac{\text{Epidosin}}{\text{Atropin}}$ (Vagusreiz, Blutdruck) = 2,48 (1,3—4,6)
7. $PR = \frac{\text{Buscopan}}{\text{Atropin}}$ (Vagusreiz, Blutdruck) = 12,4 (7,05—21,8)
8. $PR = \frac{\text{Buscopan}}{\text{Epidosin}}$ (Vagusreiz, Blutdruck) = 5,02 (2,71—9,3)

cholinolytischen Effektes war nach Epidosin und Buscopan stets mit dem ersten Testreiz (etwa 3 min nach der Injektion) erreicht; von diesem Zeitpunkt an war der Antagonismus gegen die Testreize mehr oder weniger rasch rückläufig. Atropin führte in vollwirksamen Dosierungen ebenfalls stets zu einer sofortigen Hemmung; nach geringen, unvollständig wirksamen Dosierungen war, ähnlich wie bei den Versuchen von Holtz u. Greeff[8], das Maximum der parasympathicolytischen Wirkung gelegentlich erst bei dem zweiten Testreiz festzustellen.

Am Darm konnte ein *Unterschied* zwischen den parasympathicolytisch wirksamen Dosierungen *nicht gesichert* werden; die 3 geprüften Lytica führten bei einer Dosierung von 0,1 mg/kg in der Mehrzahl der Versuche zu einer vollständigen Auslöschung des Effektes der Vagusreizung. — *Am Kreislauf* waren *Atropin* und *Epidosin* schon *in etwas geringerer Dosis* (0,025 bis 0,05 mg/kg) *wirksam*, während *Buscopan* sich *am Kreislauf* etwas *schwächer* zeigte als am Darm. Die cholinolytische Dosis von Atropin und Epidosin lag am Kreislauf wie am Darm unter 10 γ/kg; Buscopan führte erst bei einer Dosis von 0,1 mg/kg in 8 von 10 Versuchen zu einer sicheren Hemmung des Doryl-Effektes. — Die zwischen den einzelnen Substanzen bestehenden Unterschiede sind in den Tabellen sowie den Dosis-Wirkungskurven übersichtlich dargestellt. Die Abb. 2—5 geben eine Charakteristik der 3 geprüften Pharmaka.

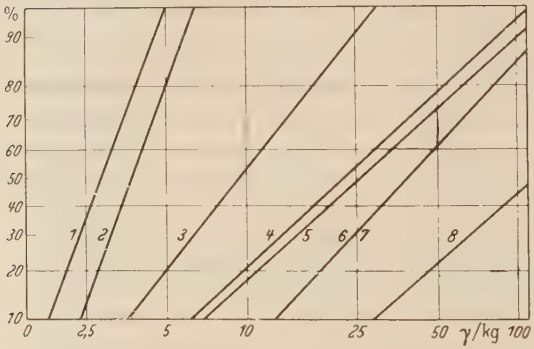


Abb. 1. *Dosis-Wirkungskurven. 1* Atropin/Doryl am Blutdruck; *2* Atropin/Doryl am Darm; *3* Atropin/Vagusreizung am Blutdruck; *4* Epidosin/Vagusreizung am Blutdruck; *5* Atropin/Vagusreizung am Darm; *6* Epidosin/Vagusreizung am Darm; *7* Buscopan/Vagusreizung am Darm; *8* Buscopan/Vagusreizung am Blutdruck

Bei der Abbildung der Dosis-Wirkungskurven sind die Wirkungsgeraden der cholinolytischen Wirkung von Epidosin nicht dargestellt, weil sie von den für Atropin ermittelten praktisch nicht abweichen. Eine Dosis-Wirkungskurve der cholinolytischen Wirkung von Buscopan konnte nicht aufgestellt werden, weil die zahlenmäßigen Unterlagen hierfür nicht ausreichen. Die bei sämtlichen Wirkungsgeraden unter Einsatz des Chi²-Testes durchgeführte Prüfung der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit mit der Normalverteilung ergab Werte von 5—20%, so daß eine befriedigende Annäherung an die Normalverteilung angenommen werden darf. Die Neigung der einzelnen Wirkungsgeraden, die als teilweise verschiedenartig imponiert ($S = 1{,}41$—$2{,}77$), zeigt keine signifikante Differenz, so daß Vergleiche auf der Basis der ED_{50} erlaubt sind. — Für die nicht signifikante größere Steilheit der Wirkungsgeraden des cholinolytischen Effektes von Epidosin und Atropin dürfte u. a. die Tatsache verantwortlich zu machen sein, daß die i.v. Injektion

von Doryl ein erheblich gleichmäßigeres Kriterium darstellt, als der elektrische Nervenreiz.

Bei der Aufstellung der Wirkungsverhältnisse (PR = potency ratio) haben wir bewußt darauf verzichtet, Relationen zwischen der parasympathicolytischen Wirkung auf Blutdruck und Darm für die einzelnen Substanzen zu berechnen, da der Blutdruck als Kriterium für einen derartigen Vergleich unzulänglich ist. Ebenso haben wir darauf verzichtet,

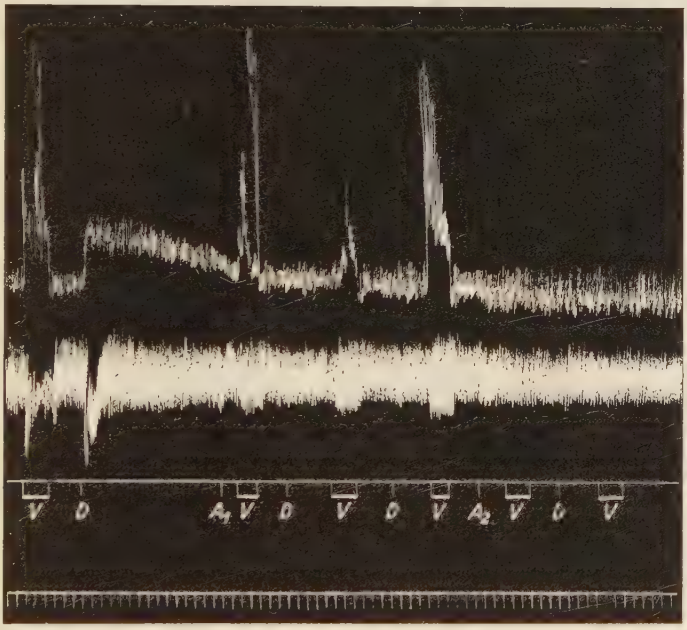


Abb. 2. *Parasympathicolytische und cholinolytische Wirkung des Atropins.* — Hund (20,6 kg) in Chloralose-Narkose. — Von oben nach unten: Darmbewegungen, Blutdruck, Signal und Zeit in Minuten; Zeitlinie: O-Linie des Blutdrucks; Unterkante der Blutdruckkurve 140 mm Hg. — *V* elektrische Reizung der peripheren Vagusstümpfe am Hals (2 Impulse/sec, 5 msec, 5 Milliamp.). — *D* 40 γ Doryl i.v.; A_1 200 γ Atropin i.v.; A_2 2 mg Atropin i.v.

Relationen zwischen der cholinolytischen und der parasympathicolytischen Wirkung der einzelnen Parasympathicolytica am Kreislauf aufzustellen; ein derartiges Vorgehen erschien uns unzulässig, weil die Testreaktionen verschiedene Substrate treffen. Die Injektion von Doryl führt zu ausgeprägter Vasodilatation, am Herzen wird eher eine gegenregulatorische Steigerung der Frequenz als eine Verminderung beobachtet. Die elektrische Vagusreizung wirkt sich dagegen überwiegend am Herzen aus, in der Gefäßperipherie kann es dabei zu gegenregulatorischer Steigerung des peripheren Widerstandes kommen. Am Ganztier mit intakter Kreislaufregulation kann unseres Erachtens ein Vergleich zwischen cholinolytischer und parasympathicolytischer

Wirkung am Kreislauf nicht angestellt werden. Trotzdem ermöglicht ein Vergleich der parasympathicolytischen Kreislaufwirkung der

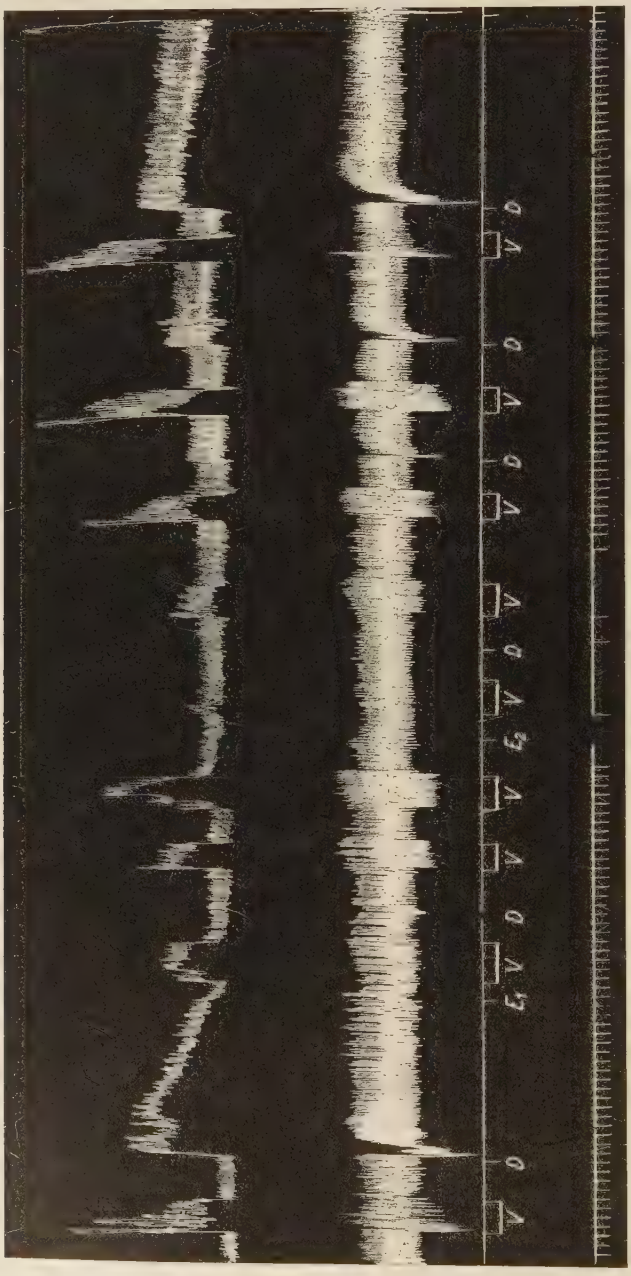


Abb. 3. *Parasympathicolytische und cholinolytische Wirkung des Epidosins.* — Hund (21,6 kg) in Chloralose-Narkose. — Von oben nach unten: Darmbewegungen, Blutdruck, Signa und Zeit in Minuten: Zeitlinie: O-Linie des Blutdrucks; Unterkante der Blutdruckkurve 130 mm Hg. — *V* elektrische Reizung der peripheren Vagusstümpfe am Hals (2 Impulse/sec, 5 msec, 7,5 Milliamp.). — *D* 44 γ Doryl i.v.; E_1 220 γ Epidosin i.v.; E_2 1,1 mg Epidosin i.v.

einzelnen Substanzen, wie er hier durchgeführt wurde (Tab. 2, 6—8), gewisse Schlußfolgerungen.

Außer den statistisch ausgewerteten Versuchen mit einer Vagusreizung von 2—5 min und „prophylaktischer" Applikation der

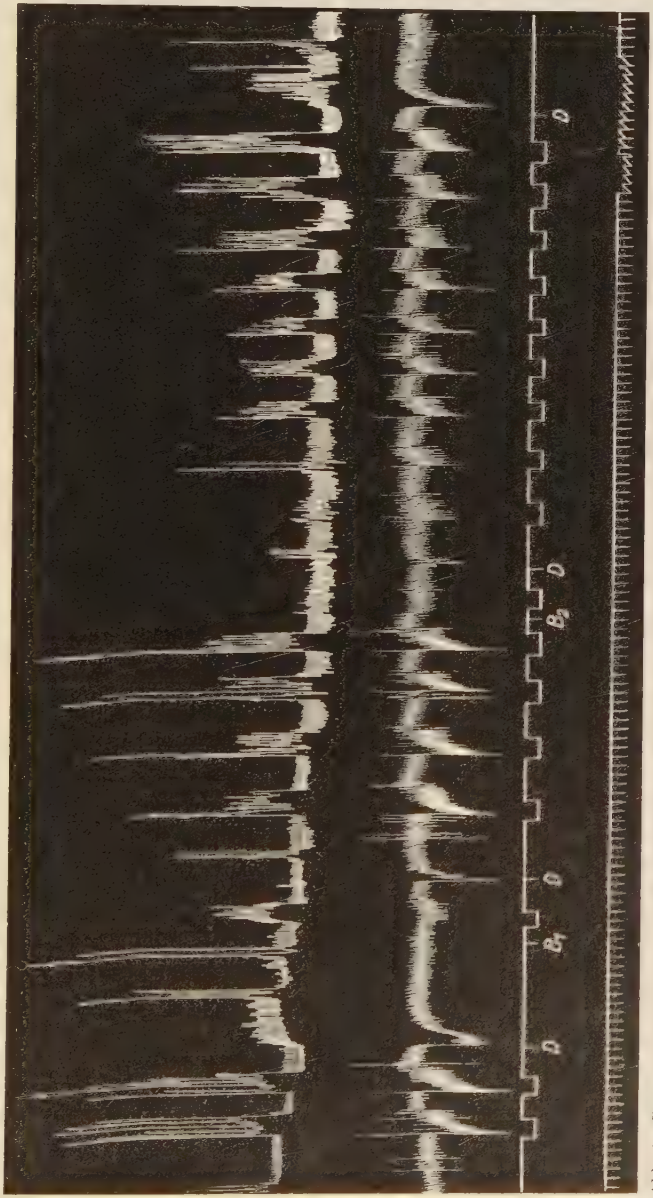


Abb. 4. *Parasympathicolytische und cholinolytische Wirkung des Buscopans.* — Hund (27,6 kg) in Chloralose-Narkose. — Von oben nach unten: Darmbewegungen, Blutdruck, Signal und Zeit in Minuten; Zeitlinie; O-Linie des Blutdrucks, Unterkante der Blutdruckkurve 140 mm Hg. Unbezeichnetes Signal: Vagusreizung (2 Impulse/sec, 5 msec, 8 Milliamp.). — *D* 56 γ Doryl i.v.; B_1 1,4 mg Buscopan i.v.; B_2 2,8 mg Buscopan i. v.

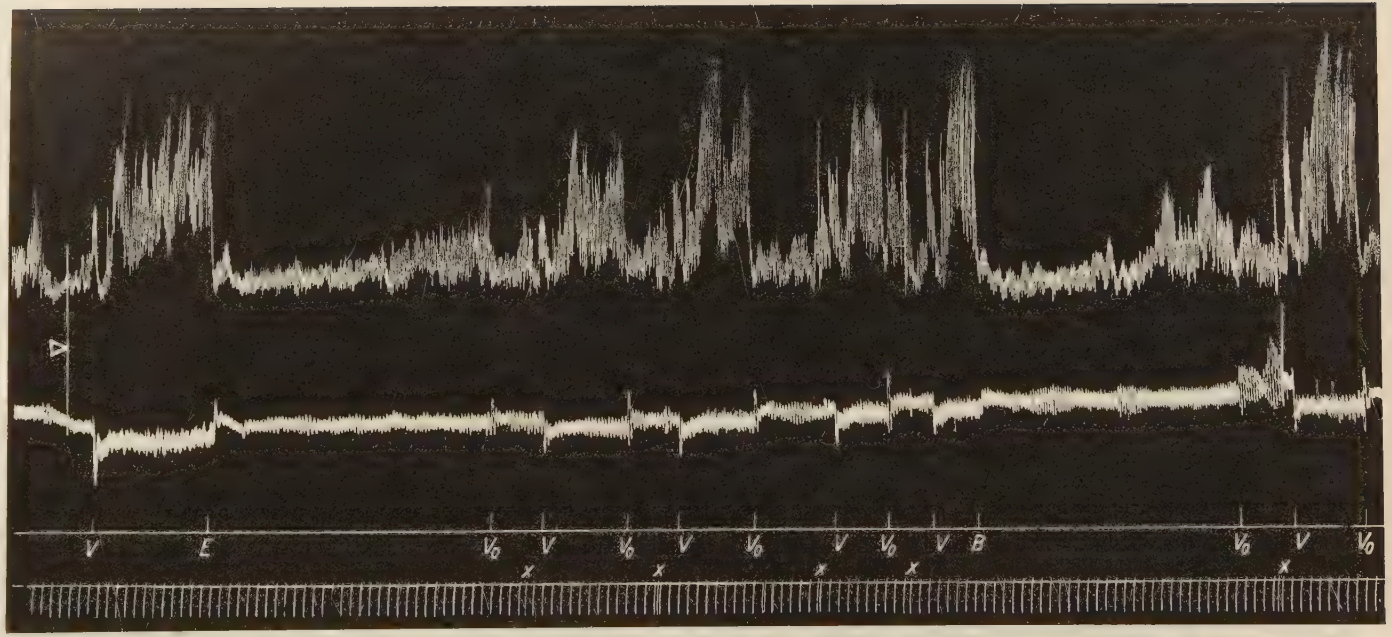


Abb. 5. *Parasympathicolytischer Effekt von Epidosin und Buscopan während einer Dauerreizung der Nn. vagi.* — Hund (12,4 kg) in Chloralose-Narkose. — Von oben nach unten: Darmbewegungen, Blutdruck, Signal und Zeit in Minuten; Zeitlinie = 0-Linie des Blutdrucks, Unterkante der Blutdruckkurve 120 mm Hg. — *V* Beginn der elektrischen Vagusreizung (2 Impulse/sec, 5 msec, 5 Milliamp.). — V_0 Ende der elektrischen Vagusreizung; *E* 31 γ Epidosin i.v.; *B* 31 γ Buscopan i.v. — *x* Kymographion 10 min angehalten

Parasympathicolytica wurden orientierende Versuche an insgesamt 15 Hunden mit „therapeutischer" Gabe der Lytica während einer Dauerreizung der Nn. vagi über 20—60 min durchgeführt. Das Ergebnis dieser Versuche entspricht qualitativ völlig demjenigen bei prophylaktischer Gabe; es besteht jedoch der Eindruck, als ob eine therapeutische Dämpfung des Vagusreizeffektes am Darm leichter und mit etwas geringerer Dosierung zu erzielen ist, als eine prophylaktische Wirkung (Abb. 5).

Auf die Tatsache, daß die vergleichende statistische Bewertung der 3 Parasympathicolytica „zeitlos" durchgeführt wurde, wurde bereits hingewiesen. Nimmt man die *Zeit als Wirkungsfaktor* hinzu, so ergeben sich *wesentliche Unterschiede*. Der *Effekt von Buscopan und Epidosin war stets flüchtig* und gut reversibel; die Reversibilität war am Darm vollständig, am Blutdruck nicht ganz vollständig. Als Kriterium für die Berechnung der mittleren Wirkungsdauer bestimmten wir deshalb die Zeit bis zur vollständigen Restitution des Effektes der Vagusreizung am Darm. Die mittlere Wirkungsdauer von 50 γ/kg Epidosin betrug 28 min ($\varepsilon \pm 1{,}8$); nach 100 γ/kg lag die mittlere Wirkungsdauer bei 49 min ($\varepsilon \pm 2{,}4$). Für Buscopan wurden entsprechende Werte von 22 min ($\varepsilon \pm 1{,}6$) und 36 min ($\varepsilon \pm 2{,}1$) ermittelt. Vergleichbare Daten für *Atropin* lassen sich nicht angeben, da die *Hemmung der Testreize in keinem* einzigen *Versuch* innerhalb der zur Verfügung stehenden Versuchsdauer (5—6 Std) *vollständig reversibel* war. Eine weitgehende Wiederherstellung des Effektes der Vagusreizung am Darm zeigte sich bei 50 γ/kg Atropin frühestens nach 2 Std; nach 100 γ/kg Atropin wurde erst gegen Schluß des Versuches (nach 5—8 Std) eine teilweise Restitution beobachtet.

Diskussion

Folgende Resultate unserer Untersuchungen erscheinen wesentlich:

1. Die Atropinempfindlichkeit der Vagusreizung am Darm.

2. Die bei Atropin und Epidosin festgestellten Differenzen zwischen cholinolytischer und parasympathicolytischer Dosis.

3. Die starke parasympathicolytische Wirkung des Buscopans bei relativ schwacher cholinolytischer Wirkung.

4. Die Wirkungsunterschiede der 3 Parasympathicolytica am Kreislauf.

5. Die relativ lange Wirkungsdauer des Atropins.

1. Besonders wichtig erscheint uns der Beweis, daß auch die *Darmwirkung einer elektrischen Vagusreizung beim Hunde atropinempfindlich* ist. Unsere Versuche stützen somit im Einklang mit den Resultaten von Greeff u. Holtz[7, 8] die Annahme, daß Acetylcholin auch im Bereich des Darmes als Überträgerstoff der postganglionären parasympathischen Fasern anzusehen ist.

Die in der Literatur angeführten Resultate über eine Atropinresistenz des Darmvagusreizes glauben wir nach unseren früheren vergeblichen Bemühungen zum großen Teil auf methodische Schwierigkeiten zurückführen zu können. Bei zahlreichen Versuchen, die wir mit höheren Reizfrequenzen durchgeführt haben, fehlte die Reproduzierbarkeit des Darmeffektes der Vagusreize. Störungen durch Steigerung des intraabdominalen Drucks sowie Veränderung des Kreislaufs und der Atmung lassen sich bei einer Reizfrequenz von 20 -50 Hz und der für Darmvagusreize erforderlichen Reizintensität praktisch nicht ausschließen.

2. Die Tatsache, daß die *parasympathicolytische Dosis* von Atropin und Epidosin am Darm 3,37—19mal *höher* liegt, *als die cholinolytische Dosis*, findet ebenfalls eine gewisse Parallele in den Ergebnissen von Greeff u. Holtz[7, 8], wo Atropin erst nach längerer Einwirkungsdauer eine parasympathicolytische Wirkung zeitigte, während die cholinolytische Wirkung sofort eintrat. Ein Unterschied könnte vielleicht darin gesehen werden, daß wir eine zeitliche „Verspätung" des parasympathicolytischen Effektes nur gelegentlich und nur bei Atropin beobachtet haben. Bei Bewertung dieses Unterschiedes muß jedoch die Verschiedenheit der Versuchsanordnung berücksichtigt werden; bei unseren Versuchen am intakten Tier spielt die Entgiftung der Parasympathicolytica eine nicht unerhebliche Rolle, so daß der am isolierten Organ beobachtete allmähliche Eintritt der parasympathicolytischen Wirkung kleiner Dosierungen verhindert wird.

Wesentlich erscheint in diesem Zusammenhang, daß auch bei der Untersuchung von Sympathicolytica eine mehr oder weniger erhebliche Differenz zwischen sympathicolytischer und adrenolytischer (bzw. noradrenolytischer) Dosis festgestellt wird. *Dem Befund, daß der Effekt einer elektrischen Nervenreizung schwieriger zu beeinflussen ist, als die Wirkung des entsprechenden humoral zugeführten (injizierten) Überträgerstoffs, dürfte somit eine allgemeingültige Gesetzmäßigkeit zugrunde liegen.* Die quantitative Differenz zwischen cholinolytischer bzw. adrenolytischer Dosis einerseits und parasympathicolytischer bzw. sympathicolytischer Dosis andererseits dürfte am ehesten mit der von Dale u. Gaddum[4] sowie Holtz[10] formulierten Theorie zu erklären sein. Hiernach ist der bei Nervenreizung gezielt freigesetzte Überträgerstoff schwieriger vom Receptor zu verdrängen, als ein humoral zugeführter Überträgerstoff, der ebenso wie das Lyticum durch Diffusion zu den Receptoren gelangen muß.

3. Während Atropin und Epidosin stärker cholinolytisch als parasympathicolytisch wirksam sind, zeigt *Buscopan* ein anderes Verhalten. Die *cholinolytische Wirkung* dieses Stoffes ist *schwächer ausgeprägt als die parasympathicolytische*; betrachtet man die parasympathicolytische Wirkung für sich allein, so tritt der Effekt am Darm stärker hervor, als derjenige am Kreislauf. Buscopan nimmt demnach innerhalb der Gruppe der Parasympathicolytica tatsächlich die Sonderstellung ein, die ihm von

Wick[22] zugesprochen wird. In Ermangelung einer anderen Erklärung möchten auch wir im Sinne von Wick annehmen, daß die relativ stark ausgeprägte parasympathicolytische Wirkungsintensität des Buscopans am Darm auf einer Dämpfung der Erregbarkeitsübertragung in den ganglionären Synapsen des parasympathischen Systems beruht. Ein direkter Nachweis für diese Theorie wird sich mit den zur Zeit möglichen Methoden schwer führen lassen, da eine isolierte prä- und postganglionäre Reizung an parasympathischen Fasern praktisch unmöglich ist.

Buscopan und Epidosin sind Stoffe, bei denen auf Grund ihrer chemischen Struktur sowohl mit einer curariformen als auch mit einer ganglioplegischen Wirkungskomponente zu rechnen ist. Diese theoretisch zu erwartenden Wirkungen lassen sich sowohl bei der Toxicitätsprüfung als auch bei präganglionärer Reizung des Halssympathicus nachweisen; die ganglioplegisch bzw. curariform wirksamen Dosierungen liegen allerdings um mehr als eine Zehnerpotenz höher als die parasympathicolytischen Dosierungen. Die am Sympathicus festgestellten ganglioplegischen Wirkungen von Buscopan und Epidosin dürften demnach als praktisch irrelevante Nebenwirkungen zu betrachten sein. - Bei der elektrischen Vagusreizung ist ein „Zusatzeffekt", der auf eine ganglioplegische Komponente zurückgeführt werden könnte, nur bei Buscopan festzustellen, während er bei Epidosin fehlt. Da der Zusatzeffekt des Buscopans, der zu einer relativ hohen parasympathicolytischen Wirkungsintensität führt, innerhalb therapeutischer Dosen auftritt, muß er als spezifisch betrachtet werden. — Die hier festgestellte Differenz zwischen Buscopan und Epidosin zeigt ebenso wie die Befunde von Kadatz u. Klupp[11] sowie Ginzel u. Mitarb.[5,6], daß die Empfindlichkeit sympathischer und parasympathischer Ganglien gegenüber pharmakologischen Eingriffen verschieden sein kann.

4. Der Befund, daß die parasympathicolytische Kreislaufwirkung der 3 von uns untersuchten Lytica signifikante Differenzen ergab, während die am Darm festgestellten Unterschiede nicht signifikant sind, führt zu dem Schluß, daß mit gewissen *Unterschieden der Empfindlichkeit der Receptoren verschiedener Organsysteme* für Parasympathicolytica gerechnet werden muß. Praktisch wesentlich erscheint die Tatsache, daß Atropin die relativ stärkste Herzwirkung ausübte, während Buscopan die schwächste Wirkung zeitigte. Vielleicht hängt die relativ schwache parasympathicolytische Wirkung des Buscopans am Herzen auch von einer geringeren Bedeutung der ganglioplegischen Komponente an diesem Organ ab.

5. Trotzdem die Untersuchung der parasympathicolytischen Wirkung am Blutdruck andere Ergebnisse zeitigte als die Untersuchung am Darm, glauben wir nicht, daß die klinisch und auch experimentell festgestellten geringeren Nebenwirkungen der als Spasmolytica eingesetzten Parasympathicolytica vom Typ des Epidosins oder Buscopans in erster Linie auf Unterschiede in der Affinität der Receptoren verschiedener Organsysteme zurückgeführt werden dürfen. Tatsächlich liegen die bei i.v. Injektion festgestellten mittleren wirksamen Dosierungen für die parasympathicolytische Wirkung am Blutdruck und am Darm in einer Größenordnung; am Einzeltier hat es oft den Anschein, als ob beide Wirkungen

annähernd parallel verliefen. Wir möchten deshalb annehmen, daß die klinisch als wesentlich geringer empfundenen „Nebenwirkungen" des Epidosins und des Buscopans in erster Linie auf der rascheren Entgiftung dieser Substanzen beruhen; diese ist ohne Frage das praktisch wichtigste Unterscheidungsmerkmal gegenüber Atropin.

Interessant erscheint ein Vergleich zwischen den von uns tierexperimentell ermittelten, am Darm parasympathicolytisch wirksamen Dosierungen mit denjenigen, die in der Therapie von Spasmen empfohlen und eingesetzt werden. Hierbei zeigt sich, daß die für Buscopan und Epidosin empfohlenen Dosierungen in der parasympathicolytischen Größenordnung liegen, während die üblichen Gaben von Atropin möglicherweise nur cholinolytisch wirksam sind und einen parasympathicolytischen Effekt nicht gewährleisten. Dieser Befund bestätigt die von Bastedo[1] geäußerte Auffassung, daß das *Atropin als Spasmolyticum eigentlich zu niedrig dosiert wird*; die für einen sicheren Effekt notwendige höhere Dosierung kann jedoch wegen der unangenehmen und relativ langdauernden Nebenwirkungen nur in vitaler Indikation empfohlen werden. Bei den synthetischen Parasympathicolytica vom Typ des Buscopans oder des Epidosins sind die Nebenwirkungen —, wahrscheinlich wegen der kurzen Wirkungsdauer —, nur wenig ausgeprägt, so daß die für eine parasympathicolytische Wirkung am Darm notwendige Dosierung appliziert werden kann. Der *Vorteil der genannten synthetischen Parasympathicolytica* gegenüber Atropin dürfte demnach in der Tatsache zu sehen sein, daß diese Substanzen die *kurzfristige Erreichung einer vollständigen parasympathicolytischen Wirkung am Darmkanal ohne unangenehme Nebenwirkungen erlauben*. Wegen der kurzen Wirkungsdauer werden derartige Stoffe allerdings nur dann vollständig befriedigend sein, wenn bereits die Durchbrechung eines „Circulus vitiosus", wie er bei Spasmen häufig vorliegt, den Enderfolg gewährleistet oder wenn das therapeutische Ziel lediglich eine Abschwächung der Erregbarkeit der glatten Muskulatur ist.

Zusammenfassung

Am Darm und am Blutdruck von Hunden in Chloralose-Narkose wurden vergleichende Untersuchungen über die parasympathicolytische und cholinolytische Wirkungsintensität von Atropin, Hyoscin-N-butylbromid (Buscopan) und Phenyl-methylvaleriansäure-β-diäthylaminoäthylesterbrommethylat (Epidosin) durchgeführt. Die parasympathicolytische Wirkung wurde mit Hilfe des Antagonismus gegen den Effekt der elektrischen Vagusreizung bestimmt; die cholinolytische Wirkung mit Hilfe des Antagonismus gegenüber i.v. Injektionen von Carbaminoylcholinchlorid (Doryl). Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Alle 3 Parasympathicolytica heben die Darmwirkung der elektrischen Vagusreizung auf. Die quantitativen Differenzen der parasympathicolytischen Wirkung am Darm sind statistisch nicht signifikant.

2. Bei Atropin und Epidosin ist die cholinolytische Dosis erheblich (3,3—19mal) geringer als die parasympathicolytische. Buscopan zeigt dagegen eine relativ starke parasympathicolytische Wirkung.

3. Bei einem Vergleich der parasympathicolytischen Wirkungsintensität am Kreislauf zeigen sich gesicherte Unterschiede zwischen den 3 Parasympathicolytica. Die mittleren wirksamen Dosen von Atropin, Epidosin und Buscopan verhalten sich wie 1:2,48:12,4.

4. Die Wirkungsdauer von Buscopan und Epidosin ist erheblich kürzer, als diejenige von Atropin.

5. Die bei Atropin und Epidosin festgestellten Unterschiede zwischen parasympathicolytischer und cholinolytischer Dosierung werden im Sinne der Theorie von Dale u. Gaddum erklärt. Die relativ starke parasympathicolytische Wirkungsintensität des Buscopans wird im Sinne der Auffassung von Wick durch eine hemmende Wirkung auf parasympathische Ganglien erklärt.

Literatur

[1] Bastedo, W. A.: J. Amer. Med. Assoc. **106**, 85 (1936). — [2] Bayliss, W. M., and H. Starling: J. of Physiol. **24**, 99 (1899). — [3] Cushny, A. R.: J. of Physiol. **41**, 233 (1910). — [4] Dale, H. H., and I. H. Gaddum: J. of Physiol. **70**, 109 (1931). — [5] Ginzel, K. H., H. Klupp, O. Kraupp u. G. Werner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 173 (1953). — [6] Ginzel, K. H., H. Klupp, O. Kraupp u. G. Werner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 336 (1954). — [7] Greeff, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 121 (1955). — [8] Greeff, K., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 427 (1956). — [9] Harrison, J. S., and B. A. McSwiney: J. of Physiol. **87**, 84 (1936). — [10] Holtz, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **208**, 223 (1949) (Diskussionsbemerkung). — [11] Kadatz, R., u. H. Klupp: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 383 (1956). — [12] Krause, D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 194 (1956). — [13] Krause, D.: Dtsch. tierärztl. Wschr. **1955**, 507. — [14] Krause, D., u. Dorothee Schmidtke-Ruhnau: Arzneimittel-Forsch. **5**, 599 (1955). — [15] Krause, D., u. Dorothee Schmidtke-Ruhnau: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 541 (1952). — [16] Lendle, L., H. Mercker u. H. Rohr: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 352 (1953). — [17] Lindner, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 357 (1955). — [18] Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — [19] Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 18 (1953). — [20] Straub, W., u. K. Stefansson: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **185**, 450 (1937). — [21] Vogt, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 1 (1949). — [22] Wick, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 485 (1951).

Prof. Dr. D. Krause, Hannover, Pharmakol. Inst. d. Tierärztl. Hochschule

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 272—280 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle)

Versuche zur Deutung des sogenannten „Vulpian-Effektes" von Curarin*

Von
W. D. Erdmann

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Mai 1956)

Die Curarisierung verläuft bei vorsichtiger Dosierung in mehreren, deutlich voneinander abgrenzbaren Etappen. $^1/_5$—$^1/_{10}$ der voll lähmenden Curarinmenge führen zunächst zu einer Erschlaffung des Muskeltonus bei erhaltener Reflexreaktion und indirekter Erregbarkeit des quergestreiften Skeletmuskels. Es ist dies ein Phänomen, das unter der Bezeichnung „lissive action von Curare" (Hartridge u. West 1931) mehrfach Gegenstand spezieller Untersuchungen war (Näheres auch bei Erdmann u. Schmidt 1956). Mit einer Steigerung der lissiven Curarindosis wird über gewisse Stadien partieller motorischer Lähmungen schließlich die volle Lähmung erreicht, das für praktische Zwecke besonders wichtige Stadium, in dem Reflex- und Willkürbewegungen aufgehoben sind, sensible Reize (Operationsschmerz!) also nicht mehr zu Abwehrbewegungen führen. Die Curarisierung ist zu diesem Zeitpunkt jedoch noch immer nicht vollständig; denn es läßt sich zeigen, daß die gegen willkürliche und reflektorische Impulse gelähmten Muskeln für die indirekte elektrische Reizung noch erregbar sind (Lendle 1925, Essen 1931 und 1934, Schneider u. Stötter 1950), ein Phänomen, das nach seinem Entdecker Vulpian (vgl. Lapicque 1947) häufig auch als „Vulpian-*Effekt*" bezeichnet wird. Erst mit einer weiteren Erhöhung der Curaredosis um 50—100% wird schließlich ein Zustand der totalen Curarisierung erreicht, wobei auch die letzten, durch indirekte Reizung ausgelösten Muskelkontraktionen verschwunden sind.

Als Erklärung für das Wesen des Vulpian-Effektes, für die Ursache, warum nach Unwirksamwerden der Rückenmarksimpulse bei mäßiger Curarisierung die indirekte faradische Erregbarkeit noch erhalten bleiben kann, sind die verschiedensten Theorien gebildet, zum Teil auch geprüft und verworfen worden. Zur Diskussion stehen praktisch jedoch nur drei *Deutungsmöglichkeiten:*

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

1. Curarin hemmt neben der neuromuskulären auch die synaptische Erregungsübertragung im Rückenmark. Zentral lähmende Curarinwirkungen sind vielfach diskutiert worden (Lit. bei McIntyre 1947). Essen (1934) hat diese Möglichkeit zur Deutung des Vulpian-Effektes dadurch auszuschließen versucht, daß er durch Gefäßunterbindung die eine Hinterextremität eines Frosches der Blutversorgung (und damit einer peripheren Curarinwirkung) entzog. Da hierbei selbst mit sehr hohen, voll lähmenden Curarindosen die Reflexerregbarkeit des abgebundenen Beines erhalten blieb, schloß Essen, daß die Veränderungen, die Curarin im Reflexablauf des intakten Frosches hervorruft, *peripheren* Ursprungs sind. Für den Warmblüter ist eine derartige Untersuchung noch nicht durchgeführt worden.

2. Die physiologischen Rückenmarksimpulse und die künstlichen, faradischen Impulse sind qualitativ verschieden. Es wurde hierbei insbesondere an Frequenzunterschiede gedacht. Daß die motorische Endplatte ein „Frequenzsieb" darstellt, ist bekannt (Bremer u. Titeca 1935, Göpfert u. Schaefer 1938, vgl. auch Naess 1952). Der Vulpian-Effekt wäre erklärbar, wenn sich unter Curarisierung die Frequenzdurchlässigkeit der motorischen Endplatte so verschieben sollte, daß die physiologischen Impulsfrequenzen nicht mehr, wohl aber noch die künstlichen, faradischen Impulse die neuromuskuläre Synapse passieren können. Essen (1931) hatte diese Möglichkeit in Betracht gezogen, aber in einer späteren Arbeit (1934) praktisch ausschließen können, weil die geprüften (Frosch-)Muskeln, die auf reflektorische Erregungen nicht mehr antworteten, auf faradische Reizung des Nerven mit den verschiedensten Frequenzen (2.5 bis 60 Imp./sec) noch reagierten.

3. Die physiologischen Rückenmarksimpulse und die künstlichen, faradischen Impulse sind quantitativ verschieden. Es ist dies eine Möglichkeit zur Erklärung des Vulpian-Effektes, an die Essen (1934) offensichtlich auch gedacht hat; experimentelle Anhaltspunkte für eine derartige Annahme lagen allerdings nicht vor. Sicher ist die Impulsintensität der physiologischen Innervation wesentlich geringer, d. h. sie umfaßt zahlenmäßig weniger erregte Nervenfasern (vgl. Lindhard 1931, Rein 1943, Fulton 1955), als die der supramaximalen indirekten elektrischen Reizung, bei der sämtliche Nervenfasern erregt werden. So erscheint es — insbesondere nach Ausschluß der zuvor genannten Möglichkeiten 1 und 2 — durchaus denkbar, daß die höhere Intensität der faradischen Reizung noch zu einem Reizerfolg führen kann, wenn die Willkürmotorik bereits gelähmt ist. Im Hinblick auf die Gültigkeit des Alles-oder-Nichts-Gesetzes an der motorischen Endplatte treten bei dieser Vorstellung allerdings einige Schwierigkeiten auf, die später zu diskutieren sein werden.

Ziel unserer Untersuchung war, den Vulpian-Effekt am Warmblüter zu demonstrieren und den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus durch Ausschluß oder Bestätigung der eben genannten Deutungsmöglichkeiten[1] zu sichern.

Methodik und Ergebnisse

Zu 1. Der dem Vulpian-Effekt zugrunde liegende Angriffspunkt von Curarin. Um Narkoseeinflüsse zu vermeiden, wurden die folgenden Versuche an decerebrierten Tieren, an denen man nur die Reflexbewegung, nicht aber die Willkürbewegung

[1] Zur Deutung des Vulpian-Effektes könnte auch eine etwaige Curarewirkung auf die γ-Fasern (Innervation der Muskelspindeln) oder auf die Muskelproprioceptoren selbst in Betracht gezogen werden. Da sich aber der Vulpian-Effekt auch am isolierten Nerv-Muskel-Präparat demonstrieren läßt (vgl. Abb. 3 und 4), *also unabhängig von afferenten und zentralnervösen Einflüssen*, wurde diese theoretisch mögliche Erklärung für den Vulpian-Effekt nicht weiter berücksichtigt.

prüfen kann, durchgeführt. Da jedoch der physiologische Nervenreiz zur Auslösung der Reflexbewegung der gleiche ist wie bei der Willkürbewegung, sind die Bedingungen vom Nerven aus gesehen für beide Reaktionsabläufe die gleichen — im Gegensatz zu den unphysiologischen Bedingungen einer Reizung des motorischen Nerven durch den elektrischen Strom.

Katzen wurden in Äthernarkose nach Sherrington decerebriert und künstlich beatmet. In die A. carotis comm. sin. wurde eine Kanüle zum Anschluß an eine Blutdruckregistrierung eingebunden. Das Registriersystem war zur Verhinderung der Blutgerinnung mit Heparin-Ringer-Lösung gefüllt. Eine Flügelkanüle für i.v. Injektionen wurde in eine V. jugularis ext. eingelegt. Der N. ischiadicus wurde

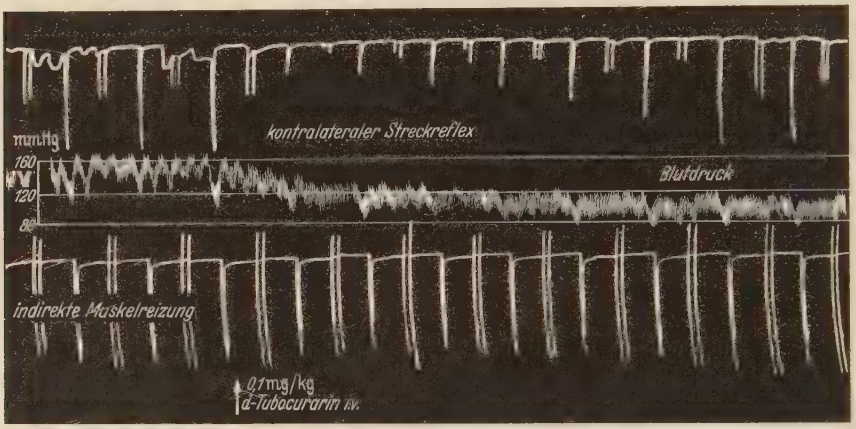


Abb. 1. 0,1 mg/kg d-Tubocurarin i. v. führen zu einer deutlichen Hemmung des kontralateralen Streckreflexes, während der indirekte Reizerfolg am Muskel kaum beeinflußt wird

einseitig freipräpariert und durchschnitten. Der zentrale wie der periphere Nervenstumpf wurden in je eine nach außen isolierte Platinelektrode eingebettet. Die Fixierung der Tiere erfolgte durch Stahldrähte, die in Hüfthöhe durch die hinteren Wirbelsäulenbänder sowie durch beide Kniegelenke geführt wurden und in Kürschnerbügeln eingespannt waren. Beide Achillessehnen wurden durchschnitten und über Rollen mit (semi-)isometrischen Hebeln verbunden. Nach Operation und Fixation ließen wir bis Versuchsbeginn 2—3 Std verstreichen.

Registriert wurden neben dem arteriellen Blutdruck der kontralaterale Streckreflex (CSR) und der Erfolg der indirekten Muskelreizung (3 Versuche). Hierzu wurden die beiden Stümpfe des N. ischiadicus gleichzeitig und unter gleichen Reizbedingungen supramaximal gereizt. Als Reizgerät verwendeten wir einen Rechteckimpuls-Generator (Medeor), wobei der Reizstromkreis alle 2 min für 2 sec geschlossen wurde. Die Dauer des Einzelimpulses betrug 0,5 msec, die Reizfrequenz 20/sec und die Reizstromstärke 2—5 mA. Zwischen diesen tetanischen Stromstößen wurden jeweils 2 Einzelimpulse ausgelöst.

Die i.v. Injektion von d-Tubocurarin in einer Dosierung (0,1 mg/kg), die die indirekte Muskelerregbarkeit noch nicht merklich zu beeinflussen vermag (beginnende Lähmung mit etwa 0,3—0,4 mg/kg dTC i.v.), führt bereits zu einer nachhaltigen Verminderung des kontralateralen Reflexes (vgl. Abb. 1). Dieser Befund demonstriert also praktisch den

Vulpian-Effekt am Warmblüter und scheint zunächst auf eine zentralnervös lähmende Wirkung von Curarin hinzuweisen.

Um eine zentralnervöse Wirkung von Curare mit Sicherheit erkennen oder ausschließen zu können, erwies es sich jetzt als notwendig, eine Versuchsanordnung zu wählen, bei der das Erfolgsorgan von einer Spenderkatze isoliert durchströmt wurde (2 Versuche). Hierzu wurde das der Aufzeichnung des CSR dienende Bein einer decerebrierten Katze im proximalen Bereich des Oberschenkels unter Schonung des N. ischiadicus abgebunden. Zur Durchströmung wurden mit Hilfe von Polyäthylenschläuchen Anastomosen zwischen der heparinisierten Spenderkatze (A. carotis comm., V. jugularus ext.) und dem isolierten Bein (A. femoralis, V. femoralis)

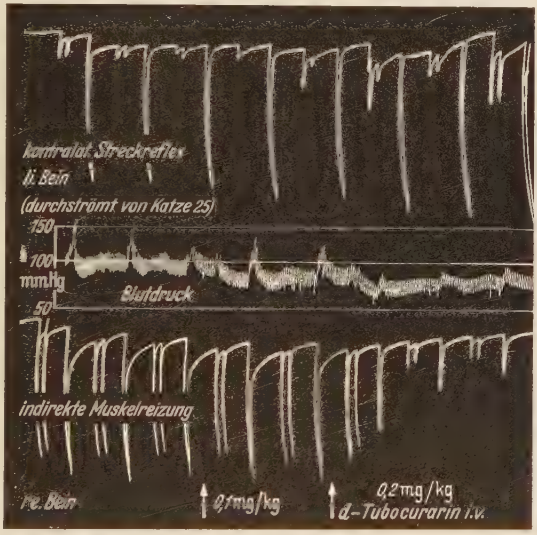


Abb. 2. Selbst in muskellähmenden Dosen besitzt d-Tubocurarin nur erregende Wirkung auf das Rückenmark: der kontralaterale Streckreflex wird bei isoliert durchströmter Hinterextremität verstärkt!

hergestellt. Von einer Curarisierung des Versuchstieres wird jetzt das isoliert durchströmte Bein nicht betroffen. Veränderungen des CSR müssen also einer zentral nervösen Wirkung von Curarin zugeschrieben werden.

Wenn man den in Abb. 1 wiedergegebenen Versuch unter diesen Bedingungen wiederholt, so zeigt sich, daß die i.v. Injektion von d-Tubocurarin (wiederum 0,1 mg/kg) jetzt zu einer Steigerung des CSR führt (vgl. Abb. 2). Eine Erhöhung der Curaredosis bis zur Muskellähmung läßt die Reflexsteigerung noch deutlicher hervortreten. Curarin besitzt demnach zweifellos erregende Wirkungen am ZNS, was von Bernhard u. Taverner (1951) auch mittels oscillographischer Technik nachgewiesen werden konnte. Die schon mit geringen Curaredosen zu beobachtende Lähmung reflektorisch ausgelöster motorischer Reaktionen kann somit nur einem peripheren Angriffspunkt von Curarin zugeschrieben werden. Es wird zu prüfen sein, ob dieser Effekt auf die frequenzsiebenden

Eigenschaften der motorischen Endplatte oder auf unterschiedliche Impulsintensitäten zurückzuführen ist (s. Punkt 2 und 3).

Zu 2. Die Abhängigkeit der Curarelähmung von der nervösen Impulsfrequenz. Über die Impulsfrequenzen bei der Muskelinnervation finden sich bei Schaefer (1942) sehr präzise Angaben. Danach bildet die motorische Endplatte in der Kette von Nerv-Endplatte-Muskel einen Engpaß, indem sie die den Muskel treffenden nervösen Impulsfrequenzen sehr stark nach unten begrenzt: die höchsten Frequenzen, welche die Endplatte noch zu passieren vermögen, liegen bei 40—60/sec, während sowohl Nerv (150/sec) als auch Muskel (80/sec) erheblich höheren Frequenzen folgen können, Frequenzen, die allerdings bei natürlicher Erregung in der Einzelfaser niemals auftreten. Die physiologische Impulsfolge arbeitet mit einer Frequenz von etwa 50/sec, dem sogenannten „Grundrhythmus", der schon aus höheren Teilen des ZNS stammt, und dem peripher also keine Hindernisse mehr erwachsen können.

Der Vulpian-Effekt könnte praktisch eine Erklärung finden, wenn sich nachweisen ließe, daß die als Frequenzsieb fungierende motorische Endplatte unter Curarin z. B. nur noch die oberen oder nur noch die niederen Frequenzen passieren läßt. Es wäre dann denkbar, daß gewisse physiologische Impulse nicht mehr beantwortet werden können, während eine optimale elektrische Reizfrequenz durch Curarin nicht beeinflußt zu sein braucht. Der Nachweis eines solchen Wirkungsmechanismus wäre relativ leicht zu führen: Bei der Aufnahme eines Frequenzspektrums (Einzelreize bis zum Tetanus von 100/sec) am normalen und curarisierten Muskel (indirekte Reizung) muß der Reizerfolg bei bestimmten Reizfrequenzen durch die Curarisierung besonders betroffen werden, und diese Frequenzen müßten der physiologischen Impulsfolge entsprechen.

Es ist bekannt, daß die „Tetanisierbarkeit" des indirekt gereizten Muskels unter Curarin leidet, d. h. höhere Reizfrequenzen führen nur noch zu einer Anfangszuckung mit schnell einsetzender und sehr starker Wedensky-Hemmung (vgl. Bremer u. Titeca 1935, Naess 1952, Sirnes 1954 u. v. a.). Die Wedensky-Hemmung (die sich erst im Laufe der Reizung ausbildet) und die Frequenzgrenze der motorischen Endplatte (die von vornherein vorhanden ist) stellen grundsätzlich verschiedene Effekte dar (Göpfert u. Schaefer 1938). Da bei unseren Untersuchungen aber nur die Frequenzdurchgängigkeit der Endplatte interessiert, ist es notwendig, die Versuchsanordnung so zu wählen, daß die Wedensky-Hemmung in das Versuchsergebnis *nicht* mit eingeht. Das läßt sich vermeiden, wenn man die Reizdauer auf 1—2 sec (vgl. auch Abb. 1 und 2) beschränkt. Zahlreiche unter diesen Bedingungen durchgeführte Versuche am Nerv-Muskel-Präparat decerebrierter Katzen zeigten, daß Curarin in für die Demonstration des Vulpian-Effektes erforderlichen Dosen (0,1 mg/kg dTC i.v.) den durch indirekte elektrische (supramaximale) Reizung ausgelösten Reizerfolg bei keiner oder aber bei allen Reizfrequenzen (geprüft: 0,06—100/sec) gleichmäßig beeinflußt (vgl. auch Naess 1952). Es läßt sich also der Vulpian-Effekt nicht damit erklären,

daß etwa gerade der bei etwa 50/sec liegende physiologische Frequenzbereich von einer Curarisierung der Endplatte besonders betroffen wird. In Anbetracht dieses negativen Ergebnisses kann auf eine spezielle Abbildung verzichtet werden. Aus der Abb. 3 können jedoch die gleichartigen Verhältnisse für Einzelreizung (4/min) und Tetanus (30/sec) bei supramaximaler und untermaximaler elektrischer Reizung entnommen werden.

Zu 3. Die Abhängigkeit der Curarelähmung von der nervösen Impulsintensität. Nachdem sich zur Erklärung des VULPIAN-Effektes weder ein zentraler Angriffspunkt von Curarin noch eine spezifische Lähmung der motorischen Endplatte gegenüber bestimmten (physiologischen) Frequenzen nachweisen ließ, bleibt zu prüfen, ob der Reizerfolg am curarisierten Muskel von der Intensität der nervösen Erregung abhängt.

Über den Einfluß der nervösen Impulsintensität auf die Muskelaktion finden sich Angaben bei LINDHARD 1931 (vgl. auch REIN 1943, FULTON 1955): Wenn der Muskel dem Alles-oder-Nichts-Gesetz entsprechend auf den Reiz reagiere — und es gäbe keine Beweise, die gegen diese Auffassung sprächen —, dann müsse man annehmen, daß eine Vermehrung der Kontraktionshöhe des Muskels nur dadurch zustande kommen kann, daß neue Neurone in den Reizprozeß mit einbezogen werden. LINDHARD folgert, daß der Muskel im lebenden Körper immer nur partiell innerviert wird und experimentell höchstens soviele Kontraktionsstufen aufweisen kann, wie die Zahl der Neurone beträgt, die an der Innervation beteiligt sind. Demnach besteht zweifellos ein erheblicher quantitativer Unterschied zwischen einer willkürlich (oder reflektorisch) und einer elektrisch (supramaximal) ausgelösten Muskelkontraktion. Eine von der Anzahl erregter Neurone bzw. motorischer Einheiten[1] abhängige Curarewirkung müßte sich experimentell bei sub- und supramaximaler indirekter Muskelreizung demonstrieren lassen.

In 10 Versuchen wurde die Wirkung einer i.v. Injektion von 0,1 mg/kg d-Tubocurarin auf den indirekt gereizten Muskel bei unter- und übermaximaler Reizstromstärke und alternierender Reizung mit Einzelimpulsen (6/min) und Tetanus (30/sec) geprüft. Als Versuchstiere dienten wie zuvor decerebrierte und in Kürschnerbügeln fixierte Katzen. Der N. tibialis (einseitig und doppelseitig) wurde in eine nach außen isolierte Platinelektrode eingebettet, der Reizerfolg am M. gastrocnemius wurde semiisometrisch (100 g Grundspannung) registriert.

Aus Abb. 3 ist zu entnehmen, daß die *supramaximale* Reizung — unabhängig von den hier gewählten Reizfrequenzen — durch Curare kaum beeinflußt wird; demgegenüber werden die durch *untermaximale* Reizung ausgelösten Muskelkontraktionen bei Einzelimpuls und Tetanus praktisch aufgehoben. *Der hier zutage tretende* VULPIAN-*Effekt ist also nicht von der nervösen Impulsfrequenz, sondern von der nervösen Impulsintensität abhängig.* Selbstverständlich ist der nervöse Impuls an der erregten *Einzel*faser bei unter- und übermaximaler elektrischer Reizung

[1] Unter einer motorischen Einheit (SHERRINGTON) versteht man eine einzelne motorische Nervenfaser zusammen mit dem Bündel Muskelfasern, die sie innerviert (FULTON 1952). Da nur diese sogenannten α-Fasern für den mechanischen Reizerfolg in Betracht kommen, brauchen auch nur diese bei unserer Fragestellung berücksichtigt zu werden.

quantitativ der gleiche (Alles-oder-Nichts-Gesetz!). Bei der submaximalen Reizung werden jedoch nur einige wenige der in der Reizelektrode liegenden Nervenfasern, bei der supramaximalen Reizung dagegen alle erfaßt. Zur Demonstration dieser Sachlage ist folgender Versuch geeignet:

An einer decerebrierten Katze wurde der N. tibialis in zwei gleichgroße Reizelektroden eingebettet. Die alternierende supramaximale Reizung mit muskelnaher und muskelferner Elektrode ergab den gleichen Reizerfolg am M. gastrocnemius (semiisometrische Registrierung). Dann wurden von dem zwischen den Elektroden liegenden Nerven so viele Fasern durchschnitten, bis der Reizerfolg der muskelfernen Elektrode deutlich abgenommen hatte[1]. An dem so hergestellten Präparat konnten jetzt Reizungen durchgeführt werden, bei denen mit Sicherheit nur die Anzahl der erregten Nervenfasern eine verschiedene war. Auch hier müßte sich also der Vulpian-Effekt demonstrieren lassen können.

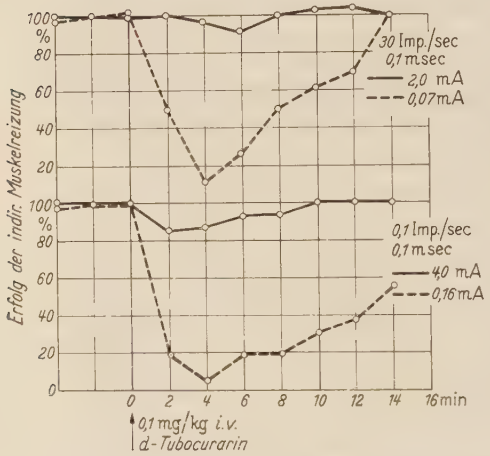


Abb. 3. Die Wirkung von 0,1 mg/kg d-Tubocurarin i.v. auf den durch unter- und übermaximale Nervenreizung ausgelösten Reizerfolg am Muskel. Die untermaximale Reizung wird wesentlich stärker betroffen

Abb. 4 gibt den wesentlichen Teil des Versuches wieder: durch eine minimale Curaredosis (0,1 mg/kg d-Tubocurarin i.v.) wird der durch die Erregung weniger Nervenfasern ausgelöste Reizerfolg schon ganz erheblich beeinträchtigt, während die durch Erregung sämtlicher Nervenfasern erzielbare Muskelkontraktion kaum verändert wird.

Sehr deutlich wird in Abb. 4 außerdem, daß die „Tetanisierbarkeit" des Muskels von der Curarisierung besonders betroffen wird. Auf S. 276 war die Problematik der während eines tetanischen Reizes auftretenden Veränderungen gestreift worden. Obwohl wir nicht daran zweifeln, daß die unter Curare zu beobachtende erschwerte Tetanisierbarkeit das Bild der Curarevergiftung am lebenden Organismus mitbestimmt, wollen wir dieses unseres Erachtens sekundäre Problem bei der Analyse des Vulpian-Effektes vorläufig unberücksichtigt lassen. Wir weisen lediglich darauf hin, daß es bei partieller Muskelinnervation schon spontan zu einer schnellen Ermüdbarkeit des Tetanus kommt (Abb. 4). Diese wird durch kleine Curaremengen extrem verstärkt. Bei maximaler Muskelinnervation zeigt sich eine „schlechte" Tetanisierbarkeit dagegen weder vor noch nach Curarin (in der von uns gewählten Dosierung!).

[1] Hierbei zeigte sich, daß eine ganze Anzahl von Fasern durchschnitten werden konnte, ohne daß dies (immer bei supramaximaler Reizung!) einen Einfluß auf den Reizerfolg am Muskel hatte. Die schrittweise durchgeführte Durchtrennung weiterer Nervenfasern führte dann plötzlich zu einer mehr als beabsichtigten Abnahme des Reizerfolges.

Mit diesem Versuch kann als erwiesen betrachtet werden, daß sich am partiell innervierten Muskel schon eine Curarelähmung manifestieren kann, die bei totaler Innervation noch nicht hervortritt. Damit findet auch der sogenannte Vulpian-Effekt seine Erklärung: da die Willkürmotorik immer eine untermaximale Erregung darstellt (s. oben), wird sie schon durch eine Curaredosis beeinträchtigt, die den supramaximalen elektrischen Reiz noch unbeeinflußt läßt.

Abschließend entsteht die Frage, wie sich dieser Effekt mit dem Alles-oder-Nichts-Gesetz der neuromuskulären Erregungsübertragung vereinbaren läßt:

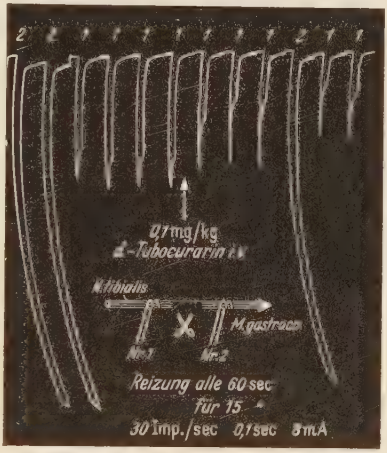


Abb. 4. Die lähmende Wirkung von Curare auf den Muskel ist abhängig von der Anzahl der ihn erregenden Nervenfasern. Näheres: vgl. im Text

Eine partiell lähmende Curaredosis wird innerhalb des Gesamtmuskels einen bestimmten Prozentsatz der motorischen Endplatten, die empfindlichsten, lähmen, die übrigen nicht (Alles-oder-Nichts-Gesetz). Nun wird natürlich die passiv mitzubewegende Masse der nicht innervierten bzw. der durch Curarin definitiv ausgefallenen Muskelfasern bei einer Teilinnervation des Muskels mehr ins Gewicht fallen als bei einer Totalinnervation. Wesentlicher aber als dieses mechanische Moment ist vielleicht die Tatsache, daß der Reizerfolg am intakten Muskel der Anzahl der erregten Nervenfasern *nicht* parallel geht (eigene, noch nicht veröffentlichte Befunde): Die für (den Muskeltonus und) die Willkürmotorik erforderliche nervöse Erregungsintensität fällt in den Bereich des steilen Kurvenanstieges (Reizerfolg bei ca. 50% erregter Nervenfasern schon nahezu maximal!), wo die geringste Verminderuug in der Anzahl aktiver motorischer Einheiten (partielle Curarisierung!) zu einer erheblichen Beeinträchtigung der mechanischen Muskelleistung führen muß.

Summary

With increasing degree of curarization the voluntary muscular action is impaired earlier than the action by indirect electrical stimulation (so called Vulpian-effect). An analysis of this phenomenon has shown, that the point of attack, responsible for the Vulpian-effect, has to be located in the region of the motor endplate (or near the endplate region in the final terminations of the nerves). The favored paralysis of the muscle to impulses from the

spinal cord does not depend on different frequencies of the nerve impulses. It depends probably on the different number of excited nerve fibres.

Literatur

Bernhard, C. G., and D. Taverner: Brit. J. Pharmacol. **6**, 540 (1951). — Bremer, F., et J. Titeca: Arch. internat. Physiol. **42**, 223 (1935). — Erdmann, W. D., u. G. Schmidt: Z. Biol. **108**, 178 (1956). — Essen, K. W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **159**, 387 (1931). — Pflügers Arch. **233**, 248 (1934). — Fulton, J. F.: Physiologie des Nervensystems. Stuttgart 1952. — Textbook of Physiology. Philadelphia 1955. — Göpfert, H., u. H. Schaefer: Pflügers Arch. **239**, 599 (1938). — Hartridge, H., and R. West: Brain **54**, 312 (1931). — Lapicque, L. et M.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **141**, 468 (1947). — Lendle, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **107**, 155 (1925). — Lindhard, J.: Erg. Physiol. **33**, 396ff. (1931). — McIntyre, A. R.: Curare, its history, nature and clinical use. Chikago 1947. — Naess, K.: Acta pharmacol. (Køpenh.) **8**, 137, 149 u. 400 (1952). — Rein, H.: Physiologie des Menschen. Berlin 1943. — Schaefer, H.: Elektrophysiologie I, S. 349ff. Wien 1942. — Schneider, H. H., u. G. Stötter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 153 (1950). — Sirnes, T. B.: Acta pharmacol. (Køpenh.) **10**, Suppl. 1 (1954). — Vulpian, H.: Leçons sur les substances toxiques. Paris 1882; zit. nach Lapicque, L. et M.

Dozent Dr. W. D. Erdmann, Göttingen, Pharmakolog. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 281—292 (1956)

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Abt. Pharmakologie, Berlin-Buch, und dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin

Über die Hämolyse durch seifenähnliche Substanzen

Von

F. Jung, J. Wendler und B. Wiegershausen

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. März 1956)

Im Verlauf unserer Studien über die Digitoninhämolyse zeigte sich, daß ein befriedigendes Verständnis der experimentellen Ergebnisse nur bei Berücksichtigung der Assoziationsneigung des Saponins möglich war. Indessen betonen jüngst Wilbrandt u. Frei eine andersartige Auffassung; nach ihrer Ansicht wird der lytische Prozeß durch eine primäre Umsetzung des Digitonins mit dem Membrancholesterin bedingt. Die Besonderheiten der Schwellungs- und Lyseprozesse wären mit Eigenartigkeiten des Cholesterineinbaus verknüpft.

Eine Stütze ihrer Auffassung sind die wichtigen Untersuchungen von Schmidt-Thomé, nach denen die Digitoninhämolyse durch eine quantitative Umsetzung des Digitonins mit dem Cholesterin charakterisiert ist. Wir bestreiten diese Umsetzung nicht und haben sie im Verlauf unserer Versuche dem Vorschlag von Schmidt-Thomé entsprechend laufend für Cholesterinbestimmungen verwertet. Wir halten sie aber für eine sekundäre Reaktion, die sich dem eigentlichen lytischen Prozeß anschließt. Dies wird bereits durch unsere früheren Versuche belegt, deren Ergebnisse zwar von Wilbrandt u. Frei teilweise angefochten werden — allerdings nicht zu Recht, sondern auf Grund einer ungenügenden Durchsicht unseres Materials. Tatsächlich decken sich unsere experimentellen Ergebnisse mitunter recht genau mit denen dieser Autoren; die Differenzen ergeben sich mit den von andersartigen Arbeitshypothesen ausgehenden verschiedenartigen Methoden der Versuchsauswertung. Zur weiteren Stützung unserer Hypothese haben wir Versuche mit einer Substanz durchgeführt, die zwar ein kräftiges Hämolyticum ist, jedoch sicherlich nicht in der für Digitonin charakteristischen Weise mit dem Zellcholesterin reagiert. Zudem ist für diese Substanz — Hexadecylsulfonat — von Lottermoser u. Püschel, Reychler, Lottermoser u. Stoll u. a. die Assoziationstendenz in wäßrigen Lösungen gut untersucht und für unsere Zwecke genügend sichergestellt. Nach Abschluß unserer experimentellen Arbeit entnehmen wir zwei kurzen Mitteilungen von Love wie Jacobs, Stout, LeFevre u. Love, daß auch diese Autoren die große Bedeutung der Micellbildung für den eigentümlichen Charakter der Lyse durch seifenähnliche Körper erkannt haben.

Methodik und Vorversuche zur Methodik

Die Technik der Hämolyseversuche war dieselbe wie in unseren früheren Mitteilungen über die Saponinhämolyse. Wir verwandten nur menschliche Erythrocyten. Das Versuchsmedium war eine phosphatgepufferte physiologische

Kochsalzlösung (1 Teil Puffer nach v. Muralt auf 4 Teile einer 0,9%igen NaCl-Lösung). Die Hämolysegeschwindigkeit wurde wieder an Hand der „Latenzzeit" des Lyseprozesses bzw. der Halbwertszeit der Hämolyse (gemessen an der Aufhellung) beurteilt. Bei der Messung der Hämolyse-Endgleichgewichte wurden stets die erhaltengebliebenen Zellen abgetrennt und das Hämoglobin im Überstehenden colorimetrisch bestimmt. Dadurch werden Täuschungen infolge trübender Zellreste oder Lysinmicellen vermieden. Wir haben bei diesen Versuchen stets diejenige Zellkonzentration zu ermitteln versucht, die genau 50% des Hämoglobins in Freiheit setzt. Dazu mußte eine größere Reihe von Hämolyseansätzen mit wechselnden Lysinmengen genau durchgemessen werden, worauf sich der 50%-Wert durch Interpolation errechnen ließ. Natürlich enthalten diese Meßreihen auch Bestimmungen des „Hämolytischen Index", d. h. der Lysinkonzentration, die eben 100% der Zellen lösen soll; sie enthalten zusätzlich diejenige Lysinkonzentration, die eben noch eine geringfügige Lyse auslöst. Wir haben beide „Meßgrößen" jedoch *nicht* angegeben, da sie als 0 bzw. 100%-Wert im statistischen Kollektiv der zerfallenden Zellen nicht definierte Größen darstellen. Wir halten es auch für bedauerlich, daß in wissenschaftlichen Studien diese Werte noch verwandt werden (vgl. etwa bei Pethica u. Schulman).

Vorversuche. Reychler hatte seinerzeit die Trübung und Gelierung von Hexadecylsulfonat-Lösungen untersucht und dabei die Feststellung gemacht, daß die ursprünglich trüben Lösungen in einem bestimmten Temperaturbereich aufklaren und über einer Grenztemperatur optisch klar sind. Dabei ergaben sich Abhängigkeiten von der Konzentration. Da solche — letztlich die Micellbildung feststellenden — Versuche in ihren Ergebnissen sehr durch die sonstige Zusammensetzung des Milieus (p_H, Fremdionen) bestimmt werden, haben wir sie für unsere Versuchsbedingungen wiederholt:

Frische Hexadecylsulfonatlösungen über $6 \cdot 10^{-6}$ g/ml sind bei Zimmertemperatur trübe. Bei Erwärmen auf 50° C klären sie sich, um sich bei Abkühlung wieder zu trüben. Wird schnell mittels Leitungswasser gekühlt, so bleiben sie noch längere Zeit klar. Alte Lösungen klären sich bei Erwärmen oder Aufkochen nur sehr zögernd. Nun wurden frisch bereitete trübe Lösungen in einem Thermostaten langsam (15 min/Grad) erwärmt und vor jeder neuen Temperatursteigerung mit einer beidseitig gesetzten Probe der Ausgangslösung verglichen. In einem zweiten Versuch wurden frische Lösungen kurz aufgekocht und dann entsprechend langsam abgekühlt (15 min/Grad) und das Auftreten der Trübung verfolgt. Die folgende kleine Tabelle gibt für die verschiedenen Temperaturen und Konzentrationen das Ergebnis wieder.

Bei Erwärmung ist somit der Klärungsbereich bei allen Konzentrationen etwa derselbe, die verdünnten Lösungen klären sich nur wenig tiefer. Bei Abkühlung ergeben sich recht erhebliche Unterschiede, indem die verdünnten Lösungen wesentlich langsamer trüber werden. — Der Vorgang als solcher ist verständlich, wenn man die Konzentrationsabhängigkeit von Assoziationsprozessen wie die Konzentrationsunabhängigkeit von Dissoziationsvorgängen in Rechnung setzt. — Für

Hämolyseversuche ist der Übergangsbereich von besonderem Interesse, da mit klaren Lösungen wegen der hohen Temperatur nicht gearbeitet werden kann. Wir haben daher eine Versuchsreihe bei Zimmertemperatur und eine zweite bei 43° C durchgeführt.

Tabelle 1

Konzentration g/ml	Erwärmung: Beginn der Aufhellung °C	Erwärmung: vollständige Klärung °C	Abkühlung: Beginn der Trübung °C	Abkühlung: Etwaiger Eintritt der definit. Trübung °C
10^{-4}	42	49	43	37
$5 \cdot 10^{-5}$	42	49	41	36
$2{,}5 \cdot 10^{-5}$	41	49	39	35
$1{,}25 \cdot 10^{-5}$	40	49	37	33
$6{,}25 \cdot 10^{-5}$	39	49	36	32

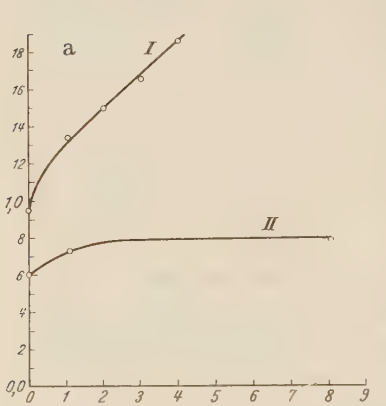
Hämolysegeschwindigkeit und Lysinkonzentration

A. Versuche bei 20° C. Alle Versuche wurden mit denselben Suspensionen menschlicher Blutzellen durchgeführt. Die Zellkonzentrationen wurden ausgezählt und auf $2{,}5 \cdot 10^8$ g/ml eingestellt (vgl. Jung u. Schwartzkopff). Der grundsätzliche Ablauf der Lyse war derselbe wie er früher für Digitonin beschrieben wurde: Nach einer Latenzperiode folgte meist ziemlich plötzlich die Aufhellung der Lysin-Zellmischung. Da die durch Auswertung der photometrischen Kurven gemessene Latenzzeit der Halbwertszeit im allgemeinen parallel ging, wird in den folgenden Darstellungen nur die Latenzzeit verwertet.

α) Ablauf der Alterung der Hexadecylsulfonatlösungen. In Abb. 1a ist die Hämolyselatenz für Hexadecylsulfonatlösungen an verschiedenen Tagen nach der Herstellung wiedergegeben. Die obere Kurve zeigt, daß *frische* Lösungen bereits innerhalb der ersten 24 Std erheblich an Aktivität verlieren (Zunahme von log L um mehr als 0,3, d. h. Verdopplung der Latenzperiode), und daß dieser Aktivitätsschwund mit wenig verminderter Geschwindigkeit sich laufend fortsetzt. Nach dem 5. Tage konnte die Latenzphase infolge der langsamen Umsetzung nicht mehr abgegrenzt werden. Werden die Lösungen kurz aufgekocht und dann mittels Leitungswasser (15° C) schnell abgekühlt („abgeschreckt"), so steigt die Aktivität an: Die Latenzzeit ist nach dieser Behandlung bei frischen Lösungen auf die Hälfte abgekürzt (untere Kurve), bei den gealterten Lösungen stellt sich fast dieselbe Aktivität ein wie bei frischen „unabgeschreckten" Lösungen (Abb. 1b, Kurve IV). Das Aufkochen hebt somit den Alterungsprozeß weitgehend auf, lediglich eine innerhalb der ersten 24 Std auftretende Inaktivierung scheint schwerer reversibel. Daher manifestiert sich der Alterungsprozeß in den Versuchen mit „abgeschreckter" Lösung

nur bei der ersten Wiederholung des Versuchs. Die Alterung beruht also nicht auf einer Zerstörung des Lysins, sondern auf einer Änderung dessen Struktur.

β) Lysinkonzentration, Alterung und Aktivität. In einer Reihe von Versuchen wurde die Hämolysegeschwindigkeit für verschiedene Lysinkonzentrationen sowohl an frischen wie gealterten Lösungen bestimmt. In jedem Fall wurde zudem sowohl unbehandelte wie „abgeschreckte"



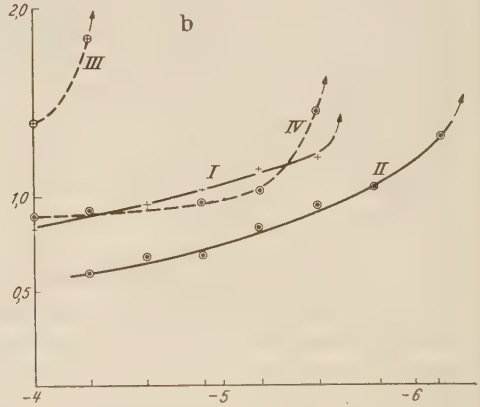


Abb. 1a. Alterung der Hexadecylsulfonatlösungen. Abszisse: Alterung in Tagen. Ordinate: Logarithmus der Latenzzeit L (in Sekunden). Kurve I: Frische unbehandelte Hexadecylsulfonatlösung. Kurve II: wie I, vorher „abgeschreckt". Zellkonzentration: $2{,}5 \cdot 10^8$ ml

Abb. 1b. Hexadecylsulfonatkonzentration, Alterung und Aktivität. Abszisse: Logarithmus der Hexadecylsulfonatkonzentration (in g/ml). Ordinate: Log L. Zellkonzentration: $2{,}5 \cdot 10^8$ ml. Kurve I: Frische unbehandelte Hexadecylsulfonatlösung. Kurve II: wie I, vorher „abgeschreckt". Kurve III: 4 Tage alte unbehandelte Hexadecylsulfonatlösung. Kurve IV: wie III, vorher „abgeschreckt"

Lösung geprüft. Abb. 1 b enthält den log der Latenzzeit gegen den log der Lysinkonzentration für frische und 4 Tage alte Lösungen aufgetragen:

Frische unbehandelte Lösungen ergeben meßbare Latenzzeiten bis hinab zu Konzentrationen um $3 \cdot 10^{-6}$ g/ml (Kurve I). Die Abhängigkeit der Latenzzeit bzw. der Hämolysegeschwindigkeit von der Konzentration ist im Bereich der wirksamen Konzentrationen sehr klein; so wirkt eine etwa 30fache Konzentration kaum mehr als doppelt so schnell. Unterhalb der Grenzkonzentration nimmt plötzlich die Latenzzeit sehr schnell zu und wird unmeßbar lang. (Wir nennen diese Grenzkonzentration „kritische Konzentration".) Nach „Abschrecken" ist im Prinzip der Verlauf derselbe, jedoch ist die Aktivität erheblich vermehrt; die kritische Konzentration liegt jetzt unterhalb $7{,}5 \cdot 10^{-7}$ (Kurve II).

4 Tage alte unbehandelte Lösungen sind sehr wenig wirksam. Die kritische Konzentration dürfte um $5 \cdot 10^{-5}$ liegen (Kurve III). Nach Abschrecken entspricht ihre Wirksamkeit der von unbehandelten frischen Lösungen (Kurve IV). In dem abgebildeten Versuch lag die kritische Konzentration zwischen 6,25 und $3 \cdot 10^{-6}$.

Wie schon bei den Versuchen mit Saponinen zeigte sich das Ergebnis dieser Versuche bei genügend verdünnten Zellsuspensionen unabhängig von der Zellzahl (vgl. JUNG u. SCHWARTZKOPFF).

B. Versuche bei 43° C. Sieht man von den absoluten Werten der Konzentrationen und Geschwindigkeiten ab, so waren die Ergebnisse mit frischen und abgeschreckten Lösungen bei Durchführung der Versuche bei 43° C dieselben wie bei den Versuchen bei Zimmertemperatur (selbstverständlich wurden die frischen wie die abgeschreckten Lösungen zum Versuch selbst unmittelbar vor diesem auf 43° C gebracht). Auf Grund des Ergebnisses der Vorversuche wurden außerdem Lösungen getestet, die unmittelbar nach dem Aufkochen nicht abgeschreckt,

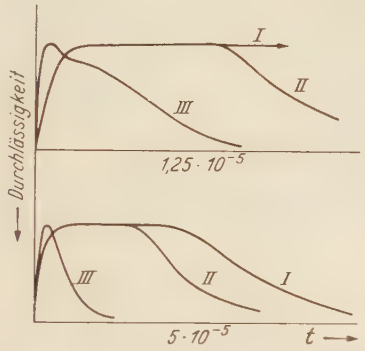


Abb. 2. Hämolyseablauf in 48 Std alter Hexadecylsulfonatlösung bei 43°C. Hexadecylsulfonat-Konzentration: $5 \cdot 10^{-5}$ bzw. $1{,}25 \cdot 10^{-5}$ g/ml. Kurve I: Unbehandelte Hexadecylsulfonatlösung. Kurve II: „Abgeschreckte" Hexadecylsulfonatlösung. Kurve III: „Aktivierte" Hexadecylsulfonatlösung

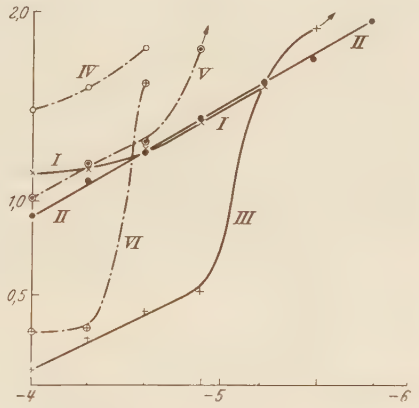


Abb. 3. Abszisse und Ordinate: siehe Abb. 1b. Zellkonzentration: $2{,}5 \cdot 10^8$ ml. Frische Hexadecylsulfonatlösung: Kurve I ×——× unbehandelt. Kurve II •——• „abgeschreckt". Kurve III +——+ „aktiviert". Gealterte Hexadecylsulfonatlösung: Kurve IV o——o unbehandelt, Kurve V ⊗——⊗ „abgeschreckt", Kurve VI ⊕——⊕ „aktiviert"

sondern in den 43° C-Thermostaten eingebracht wurden („aktiviert"). Bei diesen „aktivierten" Lösungen trat bei Hämolyseversuchen mit höheren Konzentrationen *keine* Latenzperiode auf. Geringere Konzentrationen zeigten mitunter einen zweiphasischen Verlauf der Hämolyse, geringste Konzentrationen besaßen die übliche Latenzzeit. Dies möge Abb. 2 demonstrieren, in welcher der Ablauf für einige Versuche übereinander gepaust wurde.

Abb. 3 entspricht in der Auftragetechnik Abb. 1b. Für die sehr kurzen Latenzzeiten möge beachtet werden, daß es sich um fiktive Größen handelt, die aus verschiedenen Kurven, wie in Abb. 2 mit Hilfe der Wendetangente, erhalten wurden.

Bei frischen Lösungen zeigte sich zunächst eine wesentlich geringere Differenz zwischen unbehandelter und abgeschreckter Lösung wie in den Versuchen bei Zimmertemperatur (vgl. Kurve I u. II). Die geringe Konzentrationsabhängigkeit der Latenzzeit ist wieder vorhanden. Die Hämolysegeschwindigkeiten sind bei fast allen vergleichbaren Ansätzen gegenüber den Versuchen bei 43° C etwas geringer! Völlig aus der Reihe fällt aber der Versuch mit der „aktivierten" Lösung. Diese besitzt in Konzentrationen über 10^{-5} eine außerordentlich hohe Aktivität (ohne deutliche Latenzperiode). Um 10^{-5} liegt wieder eine „kritische Konzentration", denn bei geringeren Konzentrationen nimmt die Aktivität wieder sehr schnell ab. Dabei ergibt sich die paradoxe Erscheinung, daß die Aktivität der „aktivierten Lösungen" geringer wird als die der „abgeschreckten". Die beiden Kurven II u. III überkreuzen sich nämlich.

Praktisch genau dasselbe Verhalten zeigen die gealterten Lösungen, nur liegen alle Kurven wieder in den Bereich höherer Konzentrationen verschoben, und die Wirkungssteigerung durch „Abschreckung" bzw. „Aktivierung" ist erheblich eindrucksvoller. Auch bei den gealterten Lösungen zeigt sich wieder die Überschneidung der Kurven für die „abgeschreckte" und die „aktivierte" Lösung (Kurve V u. VI).

C. Zusammenfassung und Ordnung der Einzelergebnisse. Die Ergebnisse dieser Versuche mögen wegen ihrer Unübersichtlichkeit kurz zusammengefaßt werden:

1. Die Hämolyse durch Hexadecylsulfonat besitzt im allgemeinen eine wohl abgesetzte Latenzphase.

2. Die mit Hilfe der Lysegeschwindigkeit bestimmte *Aktivität* von Hexadecylsulfonatlösungen nimmt beim Stehen laufend ab, so daß nach einigen Tagen die Hämolyse nur sehr verzögert erscheint.

3. Kurzes Aufkochen und folgendes schnelles Abkühlen führen bei frischen Lösungen zur Verdopplung der Aktivität, diejenige alter Lösungen wird sogar vervielfacht. Der Aktivitätsschwund durch die Alterung ist nach dieser Behandlung fast völlig aufgehoben.

4. Die Aktivität ist über einer bestimmten „kritischen Konzentration" von der Konzentration der Lösung nur sehr wenig abhängig. Unter dieser kritischen Konzentration sinkt sie bei weiterer Verdünnung sehr schnell ab.

5. Diese kritische Konzentration liegt bei kalten, gealterten Lösungen sehr hoch und bei frischen, aufgekochten und abgekühlten Lösungen am niedrigsten.

6. Bei 43° C ist die Differenz der Aktivität zwischen alten und frischen Lösungen gegenüber den Versuchen bei 20° C etwas vermindert.

7. Die Aktivität frischer wie aufgekochter und erst auf 20° C abgekühlter Lösungen ist bei 43° C etwas geringer als bei 20° C.

8. Werden die Lösungen aufgekocht und nur auf 43° C abgekühlt, so hämolysieren sie über einer kritischen Konzentration äußerst schnell und ohne Latenz.

9. Unter dieser kritischen Konzentration sinkt die Aktivität schnell ab. Sie kann sogar geringer werden als bei Lösungen, die nach dem Aufkochen stärker abgekühlt (20° C) worden waren.

Endwerte der Hämolyse und Lysinkonzentration

Zur Ermittlung der Endwerte des hämolytischen Prozesses wurden Versuchsreihen bei 4, 22 u. 40° C bzw. von 23, 22 u. 6 Std Lysedauer angesetzt. Wir waren uns darüber klar, daß damit nicht immer ein echter Endwert erreicht wird; eine noch länger als 24 Std hingezogene Versuchsdauer führt aber nicht nur bei mangelnder Sterilität, sondern auch infolge der sich erschöpfenden Stoffwechselprozesse zu verfälschten Ergebnissen. Das sogenannte Kationengleichgewicht an der Membran der roten Blutzelle ist ja kein reines Permeabilitätsphänomen, sondern der Ausdruck eines Fließgleichgewichtes unter Beteiligung der Glykolyse. Abb. 4 demonstriert unser Vorgehen bei der Versuchsauswertung. In der Abb. 5 sind für einige unserer Versuchsreihen die Ergebnisse niedergelegt: Es wurde jeweils die Lysinkonzentration derjenigen

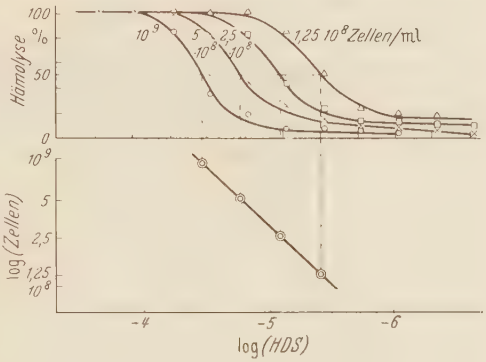


Abb. 4. Hämolysegrad und Hexadecylsulfonat-Konzentration. Oben; Abszisse: Logarithmus der Hexadecylsulfonatkonzentration (in g/ml). Ordinate: Hämolyse in Prozent. Unten; Abszisse: wie oben. Ordinate: Logarithmus der Zellkonzentration (Zellen/ml) (50%-Wert durch Interpolation ermittelt)

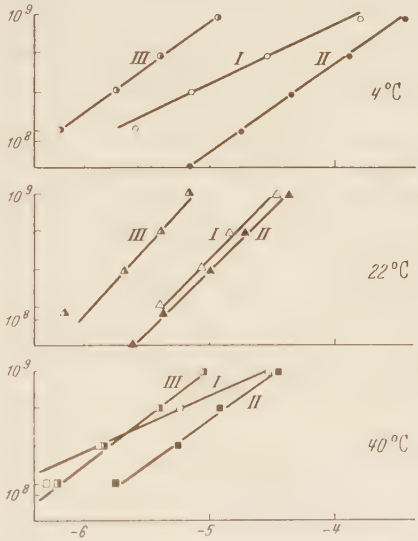


Abb. 5. 50%-Werte und Zellkonzentration: Abszisse: Logarithmus der Hexadecylsulfonat-Konzentration (in g/ml). Ordinate: Logarithmus der Zellkonzentration (Zellen/ml). Kurve I: Frische unbehandelte Hexadecylsulfonat-Lösung. Kurve II: Gealterte unbehandelte Hexadecylsulfonat-Lösung. Kurve III: wie II vorher „abgeschreckt"

Zellkonzentration gegenübergestellt, die gerade zu 50% hämolysiert wurde. Die Kurven enthalten also *nicht* den jeweiligen hämolytischen Index oder eine verwandte Größe. Sie erlauben allerdings, diesen Index abzuschätzen, falls die Steigung der Originalkurven (vgl. Abb. 4 oben) bekannt ist. Er liegt bei höheren Konzentrationen als die von uns angegebenen „50%-Werte".

Die Untersuchung von Lösungen, die nur auf 43° C abgekühlt waren, mußte aus begreiflichen Gründen unterbleiben; sie hätten sich nach Einstellung auf die Versuchstemperatur doch nicht von den — wie üblich — durch Kochen und folgendes Abkühlen reaktivierten Lösungen unterschieden.

Die reaktivierten, d. h. „abgeschreckten" Lösungen waren mit Abstand am wirksamsten. Ihr folgen für alle 3 Temperaturen zunächst die frische, dann die gealterte Lösung. (Die reaktivierte Lösung war aus der gealterten Lösung hergestellt worden.) Bei den drei verschiedenen Temperaturen zeigt sich zudem die „abgeschreckte" Lösung von praktisch gleicher Wirksamkeit. Dies scheint uns ein Hinweis auf eine wohldefinierte Reaktion des Lysins mit einem Zellbestandteil — unter Verbrauch des Lysins. In eben dieser Richtung spricht auch die für die „abgeschreckten" (wie die gealterten) Lösungen nachweisbare Proportionalität zwischen Lysin- und Zellkonzentration. Bei unserer Darstellung würde sich diese durch eine gerade Linie von 45° Steigung ausdrücken, was annähernd zutrifft. Bei den frischen Lösungen tritt eine erhebliche Abweichung auf, die man mit der mäßigen Definition der frisch aus wasserfreier Substanz hergestellten Lösung in Verbindung bringen könnte. Während also die reaktivierte Lösung eine temperaturunabhängige hohe Wirksamkeit zeigt, treten bei den anderen Lösungen Wirksamkeitszunahmen mit der Temperatur auf. Aus diesem Grund wird die Wirkungsdifferenz bei den drei Lösungen mit steigender Temperatur kleiner. Wir halten dies für einen Hinweis, daß die Umsetzung trotz der langen Versuchszeiten bei diesen Lösungen nicht ihren wirklichen Endwert erreicht hat.

Im Zuge unserer Versuche haben wir wieder bei höheren Zell- und Lysinkonzentrationen Hemmphänomene beobachten können. Diese, wie andere beobachtete Unregelmäßigkeiten könnten den Ansatzpunkt für weitere Studien bilden.

Diskussion

Unsere Ergebnisse werden durch eine Anwendung der von McBain für Seifen entwickelten Vorstellungen auf das Hexadecylsulfonat deutbar. Die Berechtigung hierzu geben die Studien Lottermosers u. a.

Die Kenntnis dieser Vorstellungen setzen wir voraus. Sie wären durch folgende Feststellungen noch zu ergänzen:

Nach E. E. Walker ist unter den verschiedenartigen Teilchen eine Fraktion mittlerer Größe (eben noch kolloid) am capillaraktivsten. Dieselbe Ansicht entwickelt auch Stoll.

Lottermoser u. Stoll stellten an wäßrigen Hexadecylsulfonatlösungen Alterserscheinungen fest (Nachlassen der Schaumfähigkeit usw.), die entsprechend einem schon von Zsigmondy u. Bachmann an Na-Palmitat beobachteten Phänomen auf ein Weiterwachsen und Verfestigung der gröberen Teilchen auf Kosten der kleineren zurückzuführen wären.

Reychler hat bei seinem Studium der Hexadecylsulfonat-Wassersysteme eine Sprungtemperatur bei etwa 40—42° C festgestellt; hier sollen sich die Micellen wesentlich verändern (verflüssigen). Bei allen Lösungs- und Temperaturveränderungen ist nach ihm mit erheblichen Hysteresephänomenen zu rechnen. Die Meßwerte von Lottermoser, Reychler u. a. sind übrigens nicht direkt auf unsere Versuche übertragbar, da die gesamten Hexadecylsulfonat-Wassersysteme in ihrem Verhalten sehr stark auch von Fremdionen bestimmt werden und wir im Hinblick auf die roten Blutzellen an sehr spezielle Lösungen gebunden waren.

Damit wird ein Teil unserer Befunde verständlich: Die bei der Alterung zunehmend auftretenden größeren und schwerer peptisierbaren Partikel bilden sich auf Kosten der aktiven Fraktionen. Gealterte Lösungen sind somit nicht nur weniger capillaraktiv und trübe, sondern enthalten eine geringere aktuelle Konzentration des Lysins. Die sogenannten frischen Lösungen — tatsächlich an demselben Tage aus kristallinem wasserfreiem Hexadecylsulfonat hergestellt — sind sicherlich schon partiell gealtert. Sie sind daher wirksamer als die einige Zeit alten Lösungen, jedoch erheblich weniger wirksam als Lösungen, in denen kurze Zeit vor dem Versuch durch Aufkochen die Micellen peptisiert wurden und durch ein schnelles Abkühlen die Assoziationsreaktion verlangsamt wurde. Bei sehr langdauernden Versuchen wie in Abb. 5, Kurve III, kommt in solchen peptisierten Lösungen praktisch das ganze Hexadecylsulfat zur Wirkung. Aus diesem Grund spielen für die Aktivität Sekundärfaktoren — wie etwa die Reaktionstemperatur — keine große Rolle. Werden aber bei solchen Versuchen Lösungen mit etwas stabileren Micellen verwandt (d. h. „frische" und gealterte Lösung), so wird die Umsetzung um so vollständiger sein, je günstiger die Dissoziationsbedingungen für die Micelle sind. Aus diesem Grunde zeigt sich in diesen Versuchen eine mit der Temperatur steigende Wirksamkeit, die gegen die Wirksamkeit der peptisierten Lösungen geht. In durchaus ähnlicher Weise sind die Differenzen der Hämolysegeschwindigkeiten zu verstehen. Im Augenblick des Zusetzens herrscht in den peptisierten Lösungen eine wesentlich höhere aktuelle Lysinkonzentration als in den „frischen" und gealterten Lösungen. Deshalb zeigen diese eine erheblich höhere Aktivität. Die Dauer des Hämolyseversuchs (wenige Sekunden) ist aber so kurz, daß während seines Ablaufs der Vorgang nicht oder kaum durch Dissoziation gröberer Micellen kompliziert wird. (Eine Lysinnachlieferung findet nicht statt.) Deshalb wird die Temperaturabhängigkeit dieses Prozesses durch andere Faktoren bestimmt. Da hier überraschenderweise eine negative Temperaturabhängigkeit auftrat — wie man sie übrigens auch von anderen Lysinen her kennt — liegt es nahe,

Adsorptionsprozesse als geschwindigkeitsbestimmend für die Kinetik anzusehen.

Nun stehen nach McBain in Lösungen seifenähnlicher Körper die molekulardispersen Teilchen und die verschiedenen Micellen miteinander in einem Temperatur- und Konzentrations-abhängigen Gleichgewicht. Wird die Lyse nur durch *eine* (oder nur durch wenige beschränkte) Sorte von Teilchen herbeigeführt und berücksichtigt man die — oben schon betonte, aber auch von Hystereseerscheinungen an Seifenlösungen längst bekannte — *langsame* Einstellung der Micellargleichgewichte, so wird auch die geringe Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von der Lysinkonzentration und das Phänomen der kritischen Konzentration verständlich. Die gröberen Teilchen stellen für die Gruppe der aktiven Teilchen sozusagen einen *nicht ganz homogenen* Bodenkörper dar. Mit steigender Lysinkonzentration steigt somit die Menge des Bodenkörpers, aber kaum die Konzentration der aktiven Teilchen. Die Lysegeschwindigkeit ist aber ausschließlich durch die letztere bestimmt, bleibt also trotz erheblicher Veränderung der Lysinkonzentration relativ konstant. Dies ändert sich in dem Augenblick, in dem der „Bodenkörper oder bestimmte Fraktionen desselben" bei Absinken der Gesamtkonzentration erschöpft ist. Nun sinkt auch die Lysinkonzentration mit der Verdünnung schnell ab. Dem Bereich dieser Konzentrationen entspricht unsere „Kritische Konzentration", unter der die Latenzzeiten plötzlich sehr lang werden. Selbstverständlich werden die Verhältnisse infolge der Alterung des Kolloids und den damit verbundenen ständigen Verschiebungen der Konzentrationswerte und des Aufbaus der Micellen für eine quantitative Betrachtung etwas unübersichtlich. Doch haben wir das Gefühl, daß das Studium dieser schnellen lytischen Reaktionen einen sonst kaum möglichen Einblick in die polydisperse Struktur der Lösungen solcher Substanzen zu vermitteln vermag.

Einen Hinweis auf das Wesen der Latenzperiode und die Natur der wirksamen Fraktionen vermitteln unsere Versuche zur Aktivierung der Lösungen. Im Prinzip fußen auch diese auf Hystereseerscheinungen, indem das Lysin durch Abkochen peptisiert wird und dann durch Abkühlen auf etwa 20° C (abgeschreckte Lösung) oder durch Abkühlen auf 43° C (aktivierte Lösung) wenigstens bis zum Kontakt mit den Zellen noch teilweise in einer speziellen Form gehalten wird. Dabei entstehen durch das Abschrecken Teilchen, die zwar sehr aktiv sind, jedoch mit einer eindeutigen Latenz hämolysieren. Das zweite Verfahren erzeugt Teilchen, welche die Zellen direkt zerstören. Allerdings scheinen diese Teilchen nicht ganz so aktiv an die Zellen gebunden zu werden, wie die bei der „Abschreck"-Behandlung entstandenen; denn bei stärkeren Verdünnungen sinkt ihre Wirksamkeit vor jenen ab. Berücksichtigt man die Herstellung beider Teilchenformen, so liegt die Annahme nahe, daß die

direkt hämolysierenden und nur bei höherer Temperatur existenzfähigen Partikel weitgehender dissoziiert sind als die Partikel der Abschreck-Behandlung. Bei Erinnerung an die Angabe von WALKER, daß die größte Capillaraktivität in Lösungen seifenähnlicher Substanzen einer bestimmten kleineren Micelle zukommt, daß ferner bei der Bindung des Lyticums in unseren Geschwindigkeitsversuchen Adsorptionsprozesse eine Rolle spielen, daß in Oberflächen-adsorbierten Seifen- oder Saponinschichten Umordnungsprozesse vorzukommen pflegen (VAN WAZER), und daß schließlich unter der kritischen Konzentration die Aktivität so auffallend schnell abfällt, werden wir recht zwangsläufig auf unsere früher für die Saponinhämolyse entwickelten Vorstellungen geführt:

Unter den üblichen Versuchsbedingungen werden Micellen einer besonders capillaraktiven Modifikation an die Zellen adsorbiert. Diese Phase I der lytischen Reaktion wird somit durch die eigentümliche Kinetik von Adsorptionsprozessen charakterisiert. Nach Anlagerung der Teilchen setzen unter der Wirkung von Oberflächenkräften Umordnungen in der adsorbierten Schicht ein, die das Lysin in seiner eigentlichen aktiven Form erscheinen läßt (Phase II). — Die III. Phase besteht in der eigentlichen Lyse der Zelle. Es ist ein Vorteil dieser Theorie, daß sie auch die Möglichkeit der Hemmzonenbildung gegen das spezielle Lysin wie andere parallel vorhandene Lysine zu deuten vermag. JACOBS u. Mitarb. erklären tatsächlich diese Hemmzonen mit Hilfe von solchen Adsorptionsschichten.

Abschließend möge nachdrücklich betont werden, daß die beiden von uns verwandten Versuchsanordnungen — Hämolysegeschwindigkeit bei schnell ablaufenden Prozessen und Hämolyseendgleichgewichte nach langer Versuchsdauer — auf Grund unserer Deutungen nur scheinbar zu widersprechenden Ergebnissen führen. Während bei den Geschwindigkeitsversuchen eine Aussage über den augenblicklichen Zustand des Lysins (Aktivität) erhalten wird, kann der Hämolyseendwert dessen eigentliche Wirksamkeit ergeben. Die quantitative Reproduzierbarkeit von hämolytischen Versuchen an Lösungen seifenähnlicher Substanzen ist nicht groß, denn die zahlreichen Variablen sind schlecht beherrschbar. Dies gilt insbesondere für die Alterung. Qualitative Aussagen über das Vorkommen und die Beeinflußbarkeit der einzelnen Phasen sind dagegen nicht schwer.

Unsere Versuche und deren Deutungen enthalten eine hier nicht ausgeführte Kritik an der von WILBRANDT geübten Behandlungsweise hämolytischer Vorgänge. Da sich WILBRANDT mit unseren Ergebnissen bei Verwendung von Digitonin als Hämolyticum auseinandersetzt, verschieben wir diese Kritik bis zur Mitteilung weiterer eigener Befunde über die Hämolyse durch Saponine.

Zusammenfassung

Der Ablauf der Hexadecylsulfonathämolyse wurde eingehend untersucht. Es läßt sich zeigen, daß die zunächst kompliziert erscheinende

Kinetik bei Anwendung der McBainschen Micellarvorstellungen für Lösungen seifenähnlicher Stoffe analysierbar wird. Der Ablauf der Hämolyse ist durch verschiedene Phasen charakterisiert: Adsorption des Lyticums; Umordnung des Lyticums an der Zellmembran; eigentliche Lyse. Er wird durch die komplizierten Übergänge zwischen den einzelnen Micellformen weiterhin bestimmt. Vermutlich sind die größeren Micellen inaktiv; eine mittlere Aggregationsstufe dürfte nicht aktiv sein, jedoch infolge großer Capillaraktivität die I. Phase der Lyse einleiten. Die eigentliche Aktivität kommt vermutlich der molekulardispersen oder einer sehr hochdispersen Form zu. Diese ist aber in normalen Lösungen nicht vorhanden (oder infolge zu geringer Konzentration bzw. Oberflächenaktivität unwirksam). Durch eine besondere Behandlung kann sie erzeugt werden. Sie dürfte aber nach Adsorption der höher molekularen Formen an der Membran gebildet werden.

Literatur

Debye, P.: J. Kolloid. Sci. **3**, 407 (1948). — Heinisch, E.: Inauguraldissertation, Berlin 1951. — Jacobs, M. H., C. M. Stout, M. W. Le Fevre and W. E. Love: Biol. Bull. **97**, 228 (1949). — Jung, F., u. K. Böhm: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 147 (1949). — Jung, F., u. L. Wirth: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 328 (1950). — Jung, F., u. I. Schwartzkopff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 563 (1952). — Loos, R.: Klin. Wetensch. **13**, 10 (1951). — Lottermoser, A., u. Mitarb.: Kolloid. Z. **63**, 49, 175 (1933). — Love, L. H.: Biol. Bull. **97**, 227 (1949). — Reychler, A.: Kolloid. Z. **12**, 277 (1912). — Ruhenstroth-Bauer, G.: Z. Naturforsch. **5b**, 250 (1950). — Schwabe, K., u. Mitarb: Wiss. Z. TH Dresden **2**, 27 (1952/53). — Stadler, J.: Text. Prax. **4**, 128 (1949). — Stauff, J.: Elektro-Chem. angew. physik. Chem. **47**, 820 (1941). — Z. physik. Chem. A. **191**, 69 (1942). — Van Wazer, J. R.: J. Colloid. Sci. **2**, 223 (1947). — Walker, E.: zit. nach Lottermoser u. Stoll, F. — Wendler, J.: Inauguraldissertation, Berlin 1951. — Wiegershausen, B.: Inauguraldissertation, Berlin 1953. — Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **241**, 289 (1938); **243**, 519—537 (1940); **245**, 22 (1942). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 463 (1955). — Wilbrandt, W., u. W. Frei: Helvet. physiol. Acta **10**, C 60—61 (1952).

Prof. Dr. F. Jung, Berlin W 8, Clara-Zetkin-Str. 94,
Pharmakol. Inst. d. Humboldt-Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 293—296 (1956)

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Abt. Pharmakologie, und dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin

Optische Effekte bei Hämolyseversuchen

Von
F. Jung

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. März 1956)

Eine von Jacobs, Wilbrandt u. a. viel verwandte Methode zum Studium von Hämolysevorgängen fußt auf der Veränderung der Lichtstreuung einer Zellsuspension mit fortschreitender Schwellung und Lyse der Zellen. Die gewonnenen Kurven sind jedoch außerordentlich komplex und infolgedessen schwer auswertbar. Schon früher haben wir auf die Bedeutung statistischer Faktoren hingewiesen. Die hier zu berichtenden Versuche erweitern das Verständnis der beobachtbaren Abläufe, indem sie eine Trennung echter lytischer von stromatolytischen Vorgängen ermöglichen.

I. Ablauf der Hämolyse durch reines Wasser

Blutzellen wurden in 0,6, 0,9 u. 4%iger Kochsalzlösung suspendiert und nach verschieden langer Zeit in destilliertes Wasser überführt. Die Hämolyse wurde direkt in der Cuvette vorgenommen, die Zellen wurden jeweils mittels einer federgetriebenen Injektionsspritze in die Wassergefüllte Cuvette gegeben. Bei diesen ersten Versuchen betrug die Schichtdicke 10 mm, die Wellenlänge 640 mμ, und es wurde paralleles Licht angewandt. Streulicht wurde hinter der Cuvette mittels Blenden abgetrennt. Abb. 1 enthält einige übereinander gezeichnete Kurven, die mittels optischer Registrierung der Durchlässigkeit der Cuvette erhalten wurden. — Die Kurven lassen sich nicht durch eine einheitliche Funktion rektifizieren. Eigentümlich ist, daß ihre Form durch die Vorbehandlung nur mäßig modifiziert wird. Nach 1stündiger Aufbewahrung in 0,9 u. 0,6%iger NaCl verschiebt sich der Hämolyseablauf nur wenig, nach 5 u. 48stündiger Aufbewahrung sind zwischen der hypo- und isotonischen Suspensionslösung praktisch keine Unterschiede feststellbar. In 4% NaCl aufbewahrte Zellen zeigen nach 1 Std zwar eine gewisse Resistenzvermehrung, um aber bereits nach Stunden eine vermehrte Zerfallstendenz aufzuweisen. Diese ist nach 48 Std sehr deutlich. Mittels osmotischer Prozesse läßt sich dieses Ergebnis auf keinen Nenner bringen. Doch wird es

verständlich, wenn man annimmt, daß NaCl die Stromatolyse fördert. Der Einsatz zeigt die Temperaturabhängigkeit des Aufhellungsvorgangs. Dazu wurde jeweils die Zeit aufgetragen, in der die Durchlässigkeit der Zellsuspension den doppelten Wert erreichte.

Wir haben schon früher zeigen können, daß die durch Abb. 1 beschriebenen Prozesse nicht Schwellungskurven und Lysekurven von

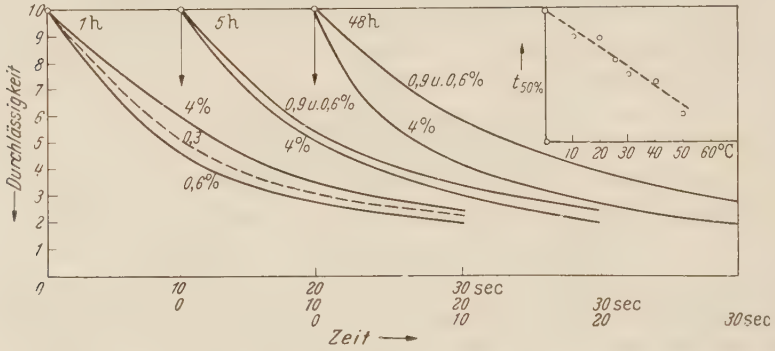


Abb. 1. Ablauf der Hämolyse durch reines Wasser. Ordinate ist die Lichtdurchlässigkeitsdifferenz der Zellsuspension gegenüber reinem Wasser. Die Abszisse stellt die Zeit dar. Die Abklingkurve entspricht dem Ablauf des Lyseprozesses. Die Zellsuspension besaß im allgemeinen 10^8 menschl. Zellen/ml. Die Temperatur betrug 20° C. Weiterhin vgl. Text

Zellen darstellen. Der Hämoglobinaustritt vollzieht sich bereits in den ersten Sekunden nach Eingabe der Zellen ins Wasser. Dies wurde damals durch Unterbrechung der Lyse mittels OsO_4 belegt.

II. Versuch zur direkten Messung der Hämoglobinausdiffusion

Wird der in Abb. 1 wiedergegebene Versuch bei 415 mμ wiederholt, so tritt bei Eingabe der Zellen in die Meßcuvette eine Lichtschwächung auf, welche die starke Absorption des Hämoglobins im Violetten zur Grundlage hat und infolgedessen konstant bleibt. Ihr überlagert sich der Effekt der Lichtstreuung. Bei dichteren Zellsuspensionen spielt es keine Rolle, ob das Hämoglobin im Innern von Zellen oder als Lösung eingebracht wurde. Aus diesem Grunde ist der Anfangsausschlag bei Durchführung eines Hämolyseversuchs (Eingabe der Zellen in Wasser) genau so groß wie bei Eingabe in eine isotone Lösung. Die Differenz des Ablaufs zwischen Hämolyseversuch und Kontrollversuch entspricht in ihrem Verlauf etwa dem Ablauf eines bei einer Wellenlänge von 678 mμ durchgeführten Versuchs. Bei dieser Wellenlänge tritt die Absorption des Hämoglobins nicht in Erscheinung.

Wird nun der Versuch mit äußerst verdünnten Zellsuspensionen durchgeführt, so zeigt der Kontrollversuch ein normales Verhalten. Im Hämolyseversuch bei 415 mμ steigt dagegen mit dem Austritt des Hämo-

globins aus den Zellen die Lichtabsorption an, da sich das bis dahin auf einige „Punkte" beschränkte sehr stark absorbierende Hämoglobin nun über die gesamte Lösung ausbreitet. Der Lichtschwächung infolge Verminderung der Lichtstreuung wird sich daher nunmehr eine Zunahme der echten Lichtabsorption überlagern. Dieser Effekt wird an den ge-

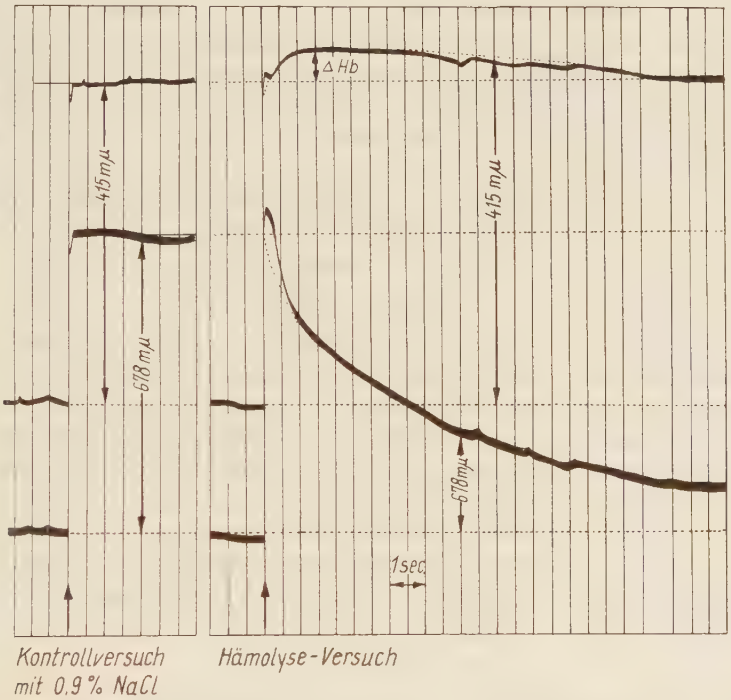


Abb. 2. Photographische Registrierung zweier Versuche mit sehr verdünnten Zellsuspensionen. Ordinate: Photostromdifferenz. Abszisse: Zeit Sekunden. — Menschl. Zellen, 20 mm Schichtdicke, etwa 10^5 Zellen/ml. Beim Pfeil Zugabe der Zellen

samten optischen Phänomenen einen um so größeren Anteil haben, je verdünnter die Zellsuspension ist. Eine einfache Überlegung zeigt, daß er vorhanden sein muß, sowie alle in einem bestimmten Lichtbündel getroffenen Zellen nicht mehr ausreichen, um bei „Hineinlegen in eine Ebene" den Querschnitt des Bündels auszufüllen. Selbstverständlich tritt der Effekt auf Grund statistischer Phänomene schon früher auf. Er läßt sich erwarten, sowie je Quadratzentimeter Querschnitt des Lichtbündels weniger als 10^7 Zellen liegen.

Abb. 2 gibt den Effekt wieder. Es handelt sich um eine Originalregistrierung der Hämolyse äußerst verdünnter Zellsuspensionen, wobei bei zwei Wellenlängen gleichzeitig die Lichtextinktion verfolgt wurde.

Die Messung bei 678 mμ gibt die Lichtstreuungsänderung, die Messung bei 415 mμ zusätzlich unseren Effekt wieder, sein Maximalausschlag wurde mit Hb vermerkt.

Bemerkenswert ist nun, daß der den Hämoglobinaustritt und die Weiterdiffusion des Hämoglobins enthaltende Effekt bereits in weniger denn 2 sec 50% seines Höchstwertes erreicht, während die eigentliche Aufhellung der Zellsuspension wesentlich langsamer verläuft. Sie erreicht in diesem Versuch erst nach etwa 6 sec ihren Halbwert. Wir halten diesen Versuch für eine sehr schlüssige Bestätigung, daß die Bestimmung der Lichtdurchlässigkeit bzw. Lichtstreuung von Zellsuspensionen keinen eindeutigen Aufschluß über das Fortschreiten von lytischen Prozessen gibt. Er zeigt auch, daß die eigentliche Lyse in recht kurzer Zeit verläuft. Aus dem Ablauf der Extinktionszunahme infolge des Hämoglobinaustritts sollte sich der Diffusionskoeffizient des Hämoglobins errechnen lassen; uns waren allerdings die Gleichungsansätze zu schwierig.

Schlußfolgerung

Beide Versuche zeigen somit eindeutig, daß die optisch bestimmte Aufhellung von Zellsuspensionen im Verlauf von Hämolyseprozessen weniger durch den Hämoglobinaustritt, d. h. den eigentlichen lytischen Vorgang, als durch Veränderungen der Stromata bestimmt wird. Diese Feststellung gilt zunächst nur für die Wasserhämolyse und kann nicht beliebig verallgemeinert werden. Nimmt man aber noch unsere frühere Feststellung einer wesentlichen Komplikation durch statistische Prozesse hinzu, so wird klar, daß quantitative Aussagen auf der Basis der Lichtstreuung kaum möglich sind. Auch Vergleiche scheinen nur dann statthaft, wenn es sich um prinzipiell verwandte Prozesse handelt.

Literatur

Jung, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 600 (1952).

Prof. Dr. F. Jung, Berlin W 8, Clara-Zetkin-Str. 94,
Pharmakol. Inst. d. Humboldt-Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 297—304 (1956)

Aus der Pharmakologischen Abteilung der Medizinischen
Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen
(Leiter: Prof. Dr. Dr. W. Koll)

Pharmakologische Untersuchungen an der quergestreiften Augenmuskulatur der Ratte

Von
Hans Kaller

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Mai 1956)

Die Bewegungen des Augapfels der Ratte in *axialer* Richtung kommen über zwei verschiedene Mechanismen zustande:

1. Der *Musculus orbitalis*, der den Inhalt der Orbita kegelmantelförmig umgibt und in die Augenlider ausstrahlt, bewirkt bei seiner Kontraktion eine *Protrusion* des Bulbus. Der Orbitalmuskel wird als glatter Muskel sympathisch über das obere Halsganglion innerviert. Über die Verwendung des Systems Halsganglion-Orbitalmuskel zu pharmakologischen Untersuchungen wurde früher berichtet (Kaller, 1955, 1956).

2. Die *quergestreiften Augenmuskeln* bewirken — wenn sie alle gleichzeitig innerviert werden — eine *Retraktion* des Bulbus. Diese Retraktion tritt physiologisch beim Cornealreflex auf. Sie läßt sich deutlich demonstrieren, wenn man bei einer Ratte, bei der nach Durchschneidung des N. facialis die Lidmuskulatur gelähmt ist, die Cornea berührt: Bei klaffender Lidspalte kommt es zu einer gut sichtbaren raschen Zurückziehung des Augapfels.

Werden der Orbitalmuskel und die quergestreifte Augenmuskulatur im Experiment gleichzeitig indirekt gereizt oder durch geeignete Pharmaka zur Kontraktion gebracht, so überwiegt die Kraft der quergestreiften Muskeln, so daß eine Retraktion resultiert. Die physiologische Bedeutung dieses Befundes kann darin erblickt werden, daß auch bei stärkster Protrusion (Adrenalinausschüttung) ein einwandfreier Lidschluß möglich ist.

Prinzip der Versuchsanordnung

Für die Verwendung der quergestreiften Augenmuskeln der Ratte zu pharmakologischen Untersuchungen sind zwei Voraussetzungen gegeben:

1. Es ist ohne Schwierigkeiten möglich, die motorischen Augennerven (III, IV, VI) elektrisch zu reizen. Die Reizung erfolgt mit Hilfe

einer Nadelelektrode, die von der äußeren Nasenöffnung aus in dem unteren Nasengang bis an die hintere Rachenwand geführt wird, und deren Spitze dann in unmittelbarer Nähe der Austrittsstelle der motorischen Augennerven, dem Foramen lacerum anterius, liegt. (Nähere anatomische Einzelheiten bei Greene.)

2. Die zu untersuchenden Substanzen können intraarteriell in die Orbita infundiert werden. Dadurch ist die Wirkung der Substanzen auf das Gesamt-Tier praktisch ohne Bedeutung. Die pharmakologischen Effekte klingen weit schneller ab als etwa bei intravenöser Zufuhr, so daß man relativ rasch hintereinander verschiedene Substanzen vergleichend prüfen kann.

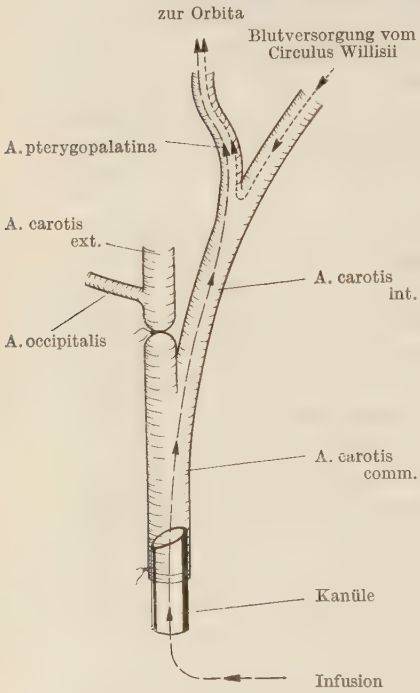


Abb. 1. Intraarterielle Infusion in die Orbita der Ratte

Die arterielle Versorgung der Orbita erfolgt bei der Ratte ausschließlich über die A. pterygopalatina. Dieses Gefäß entspringt als erster Seitenast aus der Carotis interna unterhalb der Schädelbasis und zieht durch die Paukenhöhle zu seinem Versorgungsgebiet.

Zur intraarteriellen Infusion wird die Infusionskanüle in die Carotis communis eingebunden, die Carotis externa wird dicht über der Teilungsstelle verschlossen (Abb. 1). Die Blutversorgung der Orbita erfolgt jetzt retrograd über die Carotis interna vom Circulus Willisii aus. Wird infundiert, so strömt die gesamte Infusionslösung durch die A. pterygopalatina ab, solange das in der Zeiteinheit infundierte Volumen nicht größer ist als das Strömungs-Zeit-Volumen in dieser Arterie.

Die Wahl der geeigneten Infusionsgeschwindigkeit ergibt sich damit aus röntgenographischen Bestimmungen des Strömungs-Zeit-Volumens in der A. pterygopalatina. Die Abb. 2 zeigt die Gefäßdarstellung bei verschiedenen Infusionsgeschwindigkeiten. Während bei 0,15 ml/min das Kontrastmittel in der A. pterygopalatina noch mit Blut verdünnt ist (schwacher Schatten), ist die Arterie bei 0,25 ml/min gut gefüllt. Bei 0,35 ml/min stellt sich auch der periphere Teil der Carotis interna dar, d. h. bei dieser Geschwindigkeit ist das Strömungs-Zeit-Volumen in der A. pterygopalatina überschritten, und das Kontrastmittel steigt in der Carotis interna auf. Selbstverständlich ist das Strömungs-Zeit-Volumen

stark von der individuellen Ausbildung des Circulus Willisii und auch von dem jeweiligen Blutdruck abhängig, so daß die Untersuchungen nur

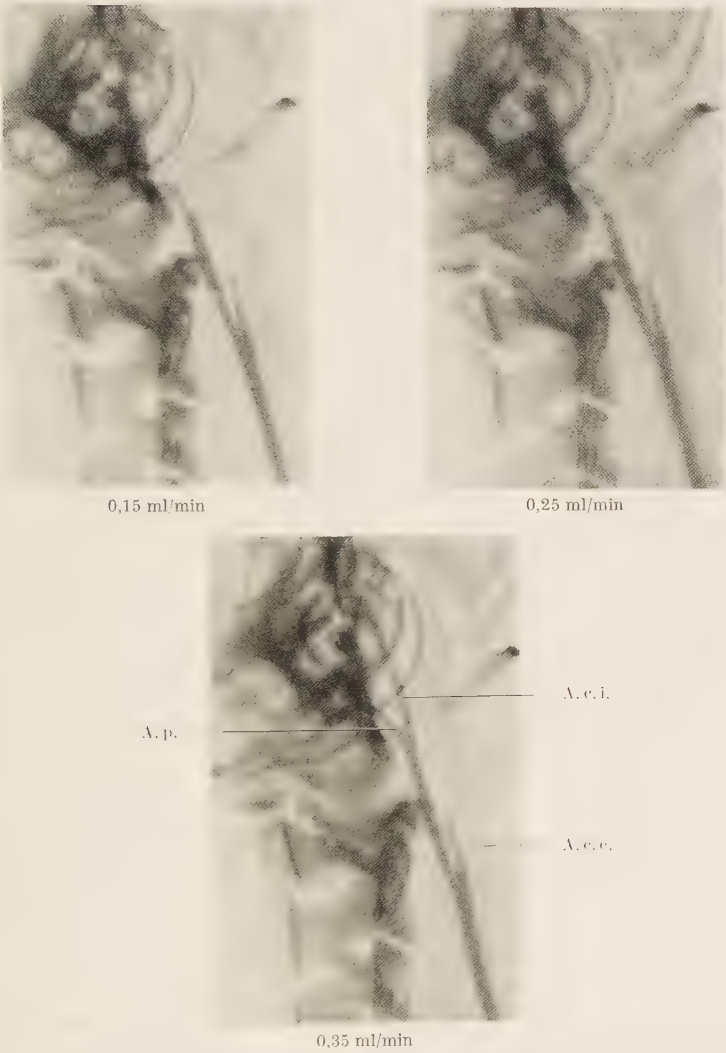


Abb. 2. Seitliche Röntgen-Aufnahmen. Infusion von 80%igem Perabrodil mit verschiedenen Geschwindigkeiten. *A.c.e.* Anfangsteil der A. carotis externa; *A.c.i.* A. carotis interna; *A.p.* A. pterygopalatina

einen Anhalt für eine Größenordnung geben können. — In den Versuchen verwendet man Infusionsgeschwindigkeiten zwischen *0,1* und *0,2* ml/min.

Bei einem Teil der Tiere erhält man mit der bisher beschriebenen Versuchsanordnung keine befriedigenden Ergebnisse: Die infundierte

Lösung gelangt nicht an die Augenmuskeln. Der Grund hierfür liegt darin, daß bei diesen Tieren die Orbita vorwiegend über anatomisch nicht definierte Anastomosen von der Gegenseite her mit Blut versorgt wird, und daß dann die infundierte Lösung nicht über die Orbita-Gefäße, sondern zum größten Teil über vorher abzweigende Äste der A. pterygopalatina abfließt. (Die Anastomosen können auch erst im Laufe einiger Versuchsstunden funktionsfähig werden; es kommt dabei zu einer scheinbaren Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber den infundierten Substanzen.) — In diesen Fällen unterbindet man zusätzlich die Carotis interna *oberhalb* der Abzweigung der A. pterygopalatina und infundiert mit höheren Geschwindigkeiten (*0,3—0,5* ml/min). Die Unterbindung der Carotis interna darf nur bei Tieren mit ausreichender Anastomosen-Versorgung der Orbita vorgenommen werden, da es sonst zu einer Mangeldurchblutung und Schädigung der Augenmuskeln kommt.

Methodik

Präparation. — In Urethan-Narkose (1,5 g/kg, je eine Hälfte subcutan und intramuskulär) wird von einem medialen Hautschnitt aus die vordere Halsmuskulatur freigelegt. Die Muskeln werden einzeln durchtrennt und auseinandergeklappt, bis schließlich die Carotis vom Schlüsselbein bis zum Zungenbein freiliegt.

Die Trachea wird eröffnet, indem man mit dem Thermokauter ein Loch in ihre vordere Wand hineinbrennt. Das Einbinden einer Trachealkanüle ist wegen der Gefahr der Verschleimung unzweckmäßig.

Zur Unterbindung der Carotis externa präpariert man zunächst bis zur Sichtbarkeit die A. occipitalis frei, die dicht über der Teilungsstelle aus der Carotis externa in lateral-dorsaler Richtung abzweigt. Mit einer feinen Nadel werden von lateral her die A. occipitalis und die Carotis externa gemeinsam umstochen. Die Nadel muß dicht an den Gefäßen geführt werden, damit die darunter verlaufende Carotis interna frei bleibt. Das obere Halsganglion, das der Carotis interna dicht oberhalb der Teilungsstelle medial anliegt, wird entfernt.

Über dem Schlüsselbein wird die Carotis communis freipräpariert. Die Infusionskanüle wird eingebunden und durch zwei Nähte an der Brustmuskulatur fixiert. Sofort nach dem Einbinden injiziert man eine kleine Menge Ringerlösung, um das Blut aus der Carotis communis herauszuspülen. Wenn nicht infundiert wird, wird der Schlauchansatz der Kanüle mit Hilfe einer kleinen Arterienklemme verschlossen.

Weitere Einzelheiten über die allgemeine Präparationstechnik finden sich in den früheren Arbeiten (Kaller, 1955, 1956).

Elektroden. Die differente Nadelelektrode (Kathode) ist etwa 0,5 bis 0,8 mm dick und hat ein stumpfes Ende. Zur Isolierung ist der sonst für kosmetische Zwecke gebräuchliche Lack für Fingernägel gut geeignet. Die Elektrode wird in den unteren Nasengang eingeführt, und zwar so, daß die Nadel in dem Winkel entlang gleitet, der vom Nasenseptum und vom Gaumen gebildet wird. Bei erwachsenen Tieren führt man die Elektrode zunächst etwa 35 mm tief ein. Die Lage der Elektrode wird später korrigiert, indem man wiederholt untermaximal reizt und bei gleichzeitiger Beobachtung des Reizerfolges die Nadel so lange verschiebt, bis die Reizbedingungen optimal sind. — Die indifferente Elektrode (Anode) ist eine nichtisolierte Nadel, die in die Beinmuskulatur eingestochen wird.

Reizung. — Alle 15 sec wird tetanisch gereizt, und zwar jeweils etwa 0,25 sec lang. Die Reizfrequenz beträgt 300 Hz, die Dauer des Einzelimpulses 0,2 msec

(Rechteckimpulse). Die benötigte Spannung liegt im allgemeinen unter 3 V. Bei richtiger Lage der Elektrode ist es möglich, die motorischen Augennerven maximal zu reizen, ohne daß es hierbei zur gleichzeitigen Erregung des motorischen Anteiles des Trigeminus (Kaumuskulatur) kommt.

Registrierung. — Der Registrierfaden wird am Auge befestigt, indem man ihn mit Hilfe einer feinen gebogenen Nadel durch den Scheitel der Cornea zieht und verknotet. Die dabei erfolgende Eröffnung der vorderen Augenkammer ist für den Versuch ohne Bedeutung. Der Faden zieht über eine Umlenkrolle zum isotonischen Hebel. Zur Vermeidung von Schleuderbewegungen ist der Hebel in geeigneter Weise gedämpft. Der Hebel ist so belastet, daß der am Bulbus wirkende Zug etwa 1 g beträgt. — Bei dieser Registriermethode können Kontraktionen des Orbitalmuskels (Protrusionen) nicht gesehen werden, da durch den Zug nach außen der Orbitalmuskel völlig entlastet ist. Will man gleichzeitig mit den Kontraktionen der quergestreiften Augenmuskeln auch die Reaktionen des glatten Orbitalmuskels beobachten, so kann man die früher beschriebene optische Registriermethode anwenden (Druckbelastung des Bulbus) (Kaller 1956).

Unterbindung der Carotis interna. — Man beginnt den Versuch mit der Infusion von 0,2 ml einer d-Tubocurarinchlorid-Lösung $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,2 ml/min. Kommt es dabei nicht zu einer mehr als 50%igen Hemmung der Retraktionen, so kann geschlossen werden, daß bei dem betreffenden Versuchstier die Blutversorgung der Orbita vorwiegend über Anastomosen von der Gegenseite her erfolgt. Zu der nunmehr notwendigen Unterbindung der Carotis interna legt man das Gefäß von der Pharynx-Seite her frei und umsticht es dicht an der Schädelbasis oberhalb der Abzweigung der A. pterygopalatina.

Ergebnisse

d-Tubocurarin. — Die Abb. 3 zeigt die Infusion verschiedener Konzentrationen (g/ml) von d-Tubocurarinchlorid. Neben der Abschwächung oder Aufhebung der durch indirekte Reizung ausgelösten Retraktionen ist auch eine Auswärtsbewegung des Bulbus zu erkennen, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß der physiologische Dauertonus der Muskeln geringer wird (lissive action). Diese Auswärtsbewegung unter Curare ist bei Schwellendosen bereits dann zu sehen, wenn die Übertragung des elektrisch ausgelösten Nervenimpulses noch nicht sichtbar beeinflußt ist.

Die Methode ist zum Nachweis kleinster Curare-Mengen gut geeignet. Bislang gilt das isolierte Ratten-Zwerchfell (Bülbring) als das empfindlichste Präparat zum Curare-Nachweis. Wilson u. Wilson geben für dieses Präparat als untere Grenze der Nachweisbarkeit die Menge 2,0 μg d-Tubocorarin an. An den Augenmuskeln der Ratte wirken bei intraarterieller Infusion noch erheblich kleinere Curare-Mengen: Bei der Infusion der Konzentration $3 \cdot 10^{-7}$ (Abb. 3) betrug die insgesamt verabreichte Menge nur 0,06 μg d-Tubocurarin. An Tieren, bei denen die Carotis interna unterbunden wurde, liegt die Schwellendosis bei 0,01 bis 0,02 μg (in 0,2 ml). — Intravenös injiziertes d-Tubocurarin zeigt — bei intakter Carotis communis — in Dosen von 0,5 –1,0 μg/Tier noch deutliche Effekte.

Dekamethonium, Succinylcholin. — Hofmann u. Lembeck haben bei ihren Untersuchungen an den äußeren Augenmuskeln des Kaninchens festgestellt, daß neuromuskulär blockierende Substanzen, die durch Depolarisation wirken, eine Kontraktur erzeugen. Die Augenmuskeln verhalten sich damit ähnlich wie die Vogelmuskeln (Ginzel, Klupp u. Werner). Wie die Abb. 4 zeigt, kommt es bei Infusion von *Dekamethonium* auch bei den Augenmuskeln der Ratte zur Kontraktur. Im Gegensatz zu den an Vogelmuskeln oder an den Augenmuskeln des Kaninchens erhobenen Befunden erreicht bei der Ratte die Kontraktur

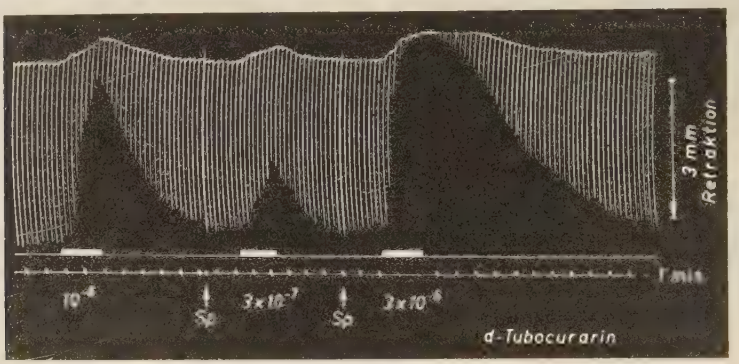


Abb. 3. Intraarterielle Infusion verschiedener Konzentrationen von d-Tubocurarinchlorid (g/ml). Infusionsgeschwindigkeit 0,1 ml/min, Infusionsdauer jeweils 2 min. Carotis interna offen. *Sp* Spülung der Infusionskanüle durch Injektion von 0,1 ml Ringerlösung, Kymo 3 min halt

jedoch niemals die Höhe der maximalen Kontraktionsfähigkeit. Die Kontraktur löst sich nur langsam, selbst wenn nach Aufhören der Infusion die Orbita wieder normal durchblutet ist. Innerhalb eines weiten Dosierungsbereiches tritt allein die Kontraktur auf, und erst bei dem 10—20fachen der kontrakturauslösenden Schwellenkonzentration kommt es zur Blockierung der neuromuskulären Übertragung.

Ein sehr ähnliches Wirkungsbild zeigt auch das *Succinylcholin* bei etwa gleicher Dosierung. Die Wirkung tritt schneller ein und ist auch schneller reversibel als beim Dekamethonium.

Der Befund von Paton u. Zaimis, daß die Ratte gegenüber depolarisierenden Substanzen sehr unempfindlich ist, bestätigt sich auch in den eigenen Versuchen. Diese Unempfindlichkeit erstreckt sich allerdings nur auf die neuromuskulär blockierende Wirkung, bezüglich der kontrakturerzeugenden Wirkung dürfte die Empfindlichkeit der Augenmuskeln der Ratte etwa die gleiche Größenordnung haben wie die Empfindlichkeit der Vogelmuskeln oder der Kaninchen-Augenmuskeln.

Dimethylphenylpiperazin (DMPP). — Chen, Portman u. Wickel beschrieben die ganglionär erregende Wirkung des DMPP (Katze). Bei der Ratte kommt es nach intravenöser Injektion von 50 μg/kg DMPP

— ebenso wie bei der Katze — zur Blutdrucksteigerung, daneben tritt aber auch eine Retraktion des Bulbus auf, die einige Sekunden dauert.

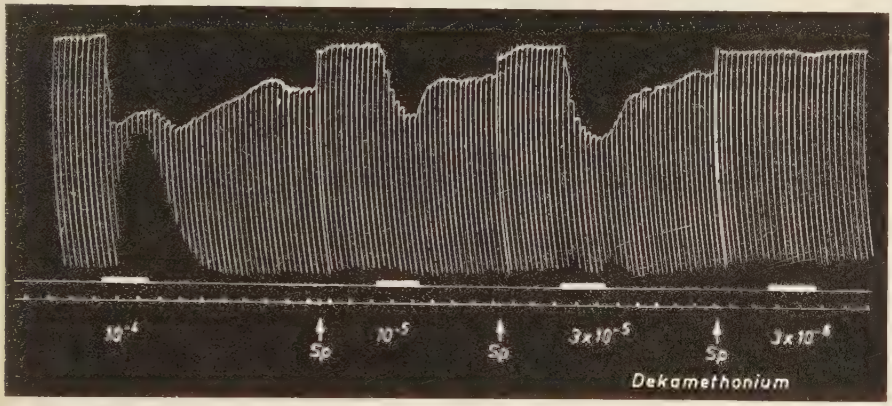


Abb. 4. Infusion von Dekamethoniumjodid (g/ml). *Sp* Spülung der Infusionskanüle, Kymo 15 min halt, während der Pause keine Reizung (schnellere Reversibilität der Kontraktur). Sonstige Daten wie Abb. 3

Die nähere Untersuchung der Substanz durch intraarterielle Infusion in die Orbita ergab, daß das DMPP, ähnlich wie das Dekamethonium und Succinylcholin, kontrakturerzeugend wirkt und in höheren Konzentrationen ebenfalls die neuromuskuläre Übertragung blockiert. Die wirksamen Konzentrationen (g/ml) betragen etwa die Hälfte bis ein Viertel der Konzentrationen von Dekamethonium. Der Wirkungseintritt ist noch schneller und die Wirkung noch flüchtiger als beim Succinylcholin. Auf Grund der Befunde kann man dem DMPP eine depolarisierende Wirkung auf die Endplattenregion zuschreiben.

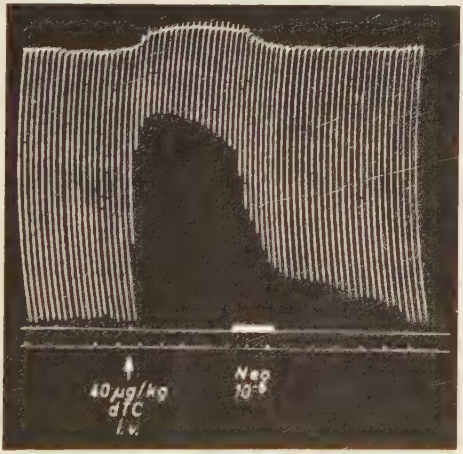


Abb. 5. Zur Erzielung einer länger dauernden Curare-Wirkung *intravenöse* Injektion von d-Tubocuarinchlorid (dTC). Die anschließende intraarterielle Infusion von Neostigminsulfat (Neo) hebt die Curarewirkung auf

Neostigmin (Prostigmin). — Die Verstärkung der Muskelkontraktionen durch Neostigmin, wie sie etwa von Hardt u. Hotovy für das Masseter-Präparat, oder von Taugner u. Fleckenstein für das Zwerchfell-Phrenicus-Präparat der Ratte beschrieben wurde, kann an den Augenmuskeln *nicht* nachgewiesen werden. Das Ausbleiben dieses

Effektes könnte auf Verschiedenheiten der Versuchsbedingungen zurückzuführen sein: Während die genannten Autoren zur Reizung Einzelimpulse verwendeten, wird bei den eigenen Versuchen durch kurzdauernde Impulsserien tetanisch gereizt. — Bei Überschreitung einer kritischen Neostigmin-Konzentration (etwa bei 10^{-6}) tritt an der Augenmuskulatur eine neuromuskulär blockierende Wirkung auf, die sehr langdauernd und oft nicht voll reversibel ist. Die Reversibilität ist besser, wenn man die regelmäßige Nervenreizung für einige Zeit unterbricht. — Die Curare-Wirkung läßt sich durch Neostigmin in bekannter Weise aufheben (Abb. 5).

Summary

A method is described for recording the retraction of the bulbus during indirect stimulation of the extrinsic eyeball muscles in the rat. A simple technique permits intraarterial infusion of drug solutions into the orbita (see Fig. 1).

By means of this method, small amounts of curarine can be detected. When decamethonium, succinylcholine and dimethylphenylpiperazine (DMPP) are infused, a lasting contracture of the muscles is to be observed.

Literatur

Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — Chen, G., R. Portman and A. Wickel: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **103**, 330 (1951). — Ginzel, K. H., H. Klupp u. G. Werner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 169 (1952). — Greene, E. C.: The Anatomy of the Rat. Transact. of the Amer. Philos. Soc. N. S. **27** (1935). New York: Hafner Publishing Co., 1955. — Hardt, A., u. R. Hotovy: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 264 (1950). — Hofmann, H., u. F. Lembeck: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 552 (1952). — Kaller, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 474 (1955). — Kaller, H.: Arch. internat. Pharmacodynamie **105**, 337 (1956). — Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Brit. J. Pharmacol. **4**, 381 (1949). — Taugner, R., u. A. Fleckenstein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 286 (1950). — Wilson, A., and H. Wilson: Amer. J. Med. **19**, 697 (1955).

Dr. Hans Kaller, Göttingen, Bunsenstr. 10

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 305—315 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens)

Zur unblutigen Blutdruckmessung am freigelegten, nicht eröffneten Gefäß mit Rußkymographion-Registrierung*

Von

Hans Friedrich Benthe

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. März 1956)

Die von Behrens u. Jacobi (1949) entwickelte Methode der Blutdruckmessung am freigelegten, nicht eröffneten Gefäß hat inzwischen verschiedene technische Abwandlungen erfahren. Das Prinzip der Methode besteht in einer Entspannung der Gefäßwand, wobei der Entspannungsdruck von einer Blattfeder erzeugt und durch einen kleinflächigen Stempel auf das Gefäß übertragen wird, so daß eine direkte mechanische Kopplung zwischen Gefäßinnendruck und Federdruck hergestellt wird. Die durch Blutpulsationen und Schwankungen ihres Niveaus hervorgerufene Biegung der Feder kann naturgemäß nur sehr gering sein, daher ist zu ihrer Registrierung eine trägheitslose und hochverstärkende Wandlerstufe erforderlich.

Als günstig erwies sich die optische Vergrößerung der Federexkursionen durch ein Mikroskop mit Photoelement und anschließender photokymographischer Registrierung. Später ist dann ein Photostromverstärker entwickelt, der eine Direktschreibung am Rußkymo ermöglicht (Behrens u. Jacobi, 1952). Wenngleich damit die registriertechnische Aufgabe befriedigend gelöst war, so blieb doch die notwendige feste Verbindung des Druckabnehmers mit einem Mikroskop eine räumlich umfangreiche und in ihrem Betrieb nicht einfache Anordnung. Wick (1953) hat dann den Druckabnehmer durch Verwendung der seinerzeit eingeführten Dehnungsmeßstreifen (Widerstandsänderung bei Dehnung) erheblich vereinfacht, allerdings auf Kosten der Direktschreibung. Hamacher u. Vater (1954) führten den Philips-Amplitudenaufnehmer (Induktivitäts-Änderung bei Druck) ein, zur Registrierung ist ein EKG-Gerät erforderlich; ein Nachteil neben der fehlenden Rußkymo-Registrierung ist hierbei die niveauunabhängige Silhouettenschreibung, bei der Blutdruckschwankungen nur durch wechselnde Breite eines Schreibbandes wiedergegeben werden. In angelsächsischen Ländern findet eine Elektronenröhre (RCA 5734) mit beweglicher Anode als Druckabnehmer Verwendung.

Die zahlreichen Störungen durch Blutgerinnung, Sperrflüssigkeiten, Eigenwirkung von Antikoagulantien bei blutiger Blutdruckschreibung veranlaßten uns, die unblutige Methode von Behrens weiter zu entwickeln. Dafür waren folgende Forderungen maßgebend:

1. Einfache praktische Handhabung des Druckabnehmers und geringe Raumbeanspruchung am Versuchstier,

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

2. übliche Niveauschreibung des Blutdruckes auf Rußkymo,
3. Sichtbarmachung der Pulskurve auf Braunschem Rohr,
4. geringe Kosten der gesamten Anordnung, Herstellung durch Institutswerkstatt.

Unter diesen Gesichtspunkten wählten wir zur meßtechnischen Verwertung der mechanischen Druckänderungen an der Blattfeder Dehnungsmeßstreifen (DMS, Typ Philips 9211), von denen auf Unter- und Oberseite der Blattfeder jeweils ein Streifen fest aufgeklebt wird und prinzipiell als variabler Widerstand in einer Wheatstoneschen Brücke arbeitet. Für die Direktschreibung auf Rußkymo sollte der von Lullies (1939) angegebene, in seinen Abmessungen erheblich reduzierte Magnet-Schreiber benutzt werden.

Dieses Schreibsystem besitzt einen Spulenwiderstand von 500 Ω und erfordert zur vollen Aussteuerung eine Leistung von 2 Watt, d. h. einen Strom von 63 mA. Die von uns verwendete Kathodenstrahlröhre DB 7 benötigt zur vollen Ausnutzung des Bildschirmes 400 V s/s. Demgegenüber steht die sehr geringe Widerstandsänderung des DMS, die auch bei Gegentaktschaltung und höchstzulässiger Dehnung etwa 0,19 Ω = 0,156% beträgt und im Diagonalzweig der Brücke bei dem zulässigen Meßstrom von 20 mA eine Stromänderung von 31,2 μA ergibt, die nur mit empfindlichem Galvanometer meßtechnisch ausgewertet werden kann (Wick 1953). Da ein Gleichspannungsverstärker wegen seiner stets vorhandenen Unstabilität (Inkonstanz der Nullage) für die weitere Verstärkung unbrauchbar ist, fand folgendes Verfahren Anwendung.

Prinzip

Es wird von dem sogenannten Trägerfrequenz-Verfahren Gebrauch gemacht. Als Brückenspannung wählten wir eine tonfrequente Wechselspannung, die sich bei maximaler Biegung der DMS im Diagonalzweig um 3,43 mV ändert. Bei normalem Betrieb tritt nur ein Teil dieser Spannungsänderung auf, und zwar setzt sie sich als Modulation der tonfrequenten Trägerspannung zusammen aus dem diastolischen Ausgangsdruckniveau und den einzelnen Pulsdruckwellen. Diese modulierte Wechselspannung wird verstärkt, gleichgerichtet; in einem nachfolgenden Tiefpaß wird nur der Modulationsinhalt, also der Gleichspannungswert des Druckniveaus mit den tieffrequenten Schwankungen der Pulsdruckwellen durchgelassen, der nun einerseits in eine Leistungsverstärkerstufe für Magnet-Schreiber und andererseits in eine Spannungsverstärkerstufe für Braunsches Rohr gegeben wird.

Einzelheiten

Als Druckaufnehmer bewährte sich eine Blattfeder aus Bronzefederblech, auf deren Ober- und Unterseite je ein DMS aufgeklebt war. Diese Gegentaktschaltung hat den Vorzug doppelter Empfindlichkeit, da die Dehnung des einen Streifens mit einer Stauchung des anderen verbunden ist. Gleichzeitig sorgt die Anordnung für ausreichende Kompensation von Temperatur und Feuchtigkeitseinflüssen auf die Widerstandswerte.

Die Vergleichswiderstände $2 \cdot 1\ K\Omega$ befinden sich im Gerät; parallel zu dem einen liegen $20\ K\Omega$ in Reihe mit einem Potentiometer (P_3) von

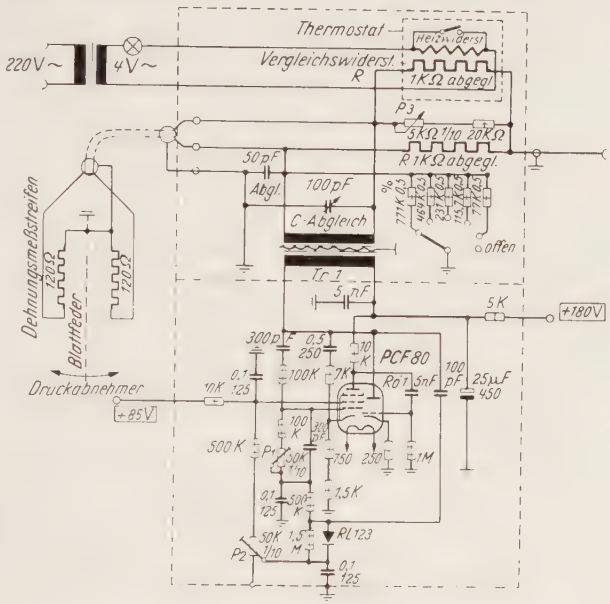


Abb. 1a. Oberer Teil: Brückenschaltung der DMS (Vergleichswiderstände R im Thermostaten) mit Eichwiderständen, unterer Teil: 4000 Hz Oscillator

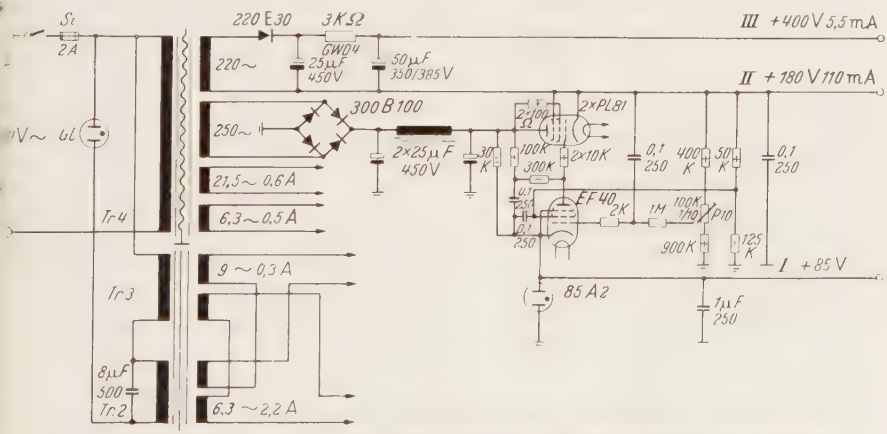


Abb. 1a. Unterer Teil: Netzteil für Heiz- und Oberspannungen mit elektronischer Stabilisierung

$5\ K\Omega$, mit dem die mechanische Nullstellung der Druckfeder, die für die DMS eine Anfangsspannung darstellt, auf elektrischem Wege ausgeglichen wird.

Da die Empfindlichkeit der DMS, also die Widerstandsänderung pro Dehnung von der Herstellerfirma angegeben wird, ist es möglich, dem einen Vergleichswiderstand einen jeweils genau errechneten und geeichten Hochohmwiderstand parallel zu schalten, wodurch die Brücke um den Betrag aus dem Gleichgewicht kommt, welcher der zugehörigen Dehnung entspricht. Entsprechend ist das Meßinstrument im Leistungsausgang des Gerätes in μ-Dehnung geeicht, so daß daran bei unbekannter Biegung des DMS seine tatsächliche Dehnung abgelesen werden kann. Als Dehnungsbereiche wählten wir 75, 125, 250, 500, 750 μ-Dehnung (Abb. 1a).

Um Störungen durch die Netzfrequenz und deren Oberwellen auszuschalten, wählten wir eine Trägerfrequenz von 4,97 kHz, die also etwa 100mal größer als die Netzfrequenz ist und gleichzeitig in einem ungeraden Verhältnis zu ihr steht. Da das Frequenzspektrum der Pulskurve bis etwa 200 Hz reicht, wurde zur unverfälschten trägheitslosen Aufzeichnung der Pulskurve die Bandbreite des gesamten Systems auf etwa 400 Hz festgelegt.

Die Erzeugung der Trägerfrequenz erfolgte mit der Pentode der Röhre I (Abb. 1a). Die Verwendung der „Wien-Brücke", in der nur R-C-Glieder frequenzbestimmend sind, bedingt geringen Aufwand. Die Frequenzeinstellung wird mit dem Widerstandsregler P 1 vorgenommen. Bei dem für die DMS angegebenen zulässigen Meßstrom von 20 mA beträgt die zulässige Brückenspannung $2 \cdot 120 \cdot 20 \cdot 10^{-3} = 4{,}8$ V. Es wurden 4,4 V gewählt, die mit dem Widerstandsregler P 2 eingestellt werden. Zur erdfreien Auskopplung der Trägerfrequenzspannung auf die Brücke dient der Transformator Tr. 1, der den Arbeitswiderstand der Triode bildet. Für die Trägerfrequenz stellt der Transformator primärseitig einen Wechselstromwiderstand von 4 KΩ dar; er transformiert also den Verbrauchswiderstand der Brücke von 240 Ω auf den etwa 17fachen Wert, so daß die Primärspannung $4{,}4 \cdot \sqrt{17} = 18$ V betragen muß. Die Primärinduktivität wählten wir so groß, daß mit dem der Wicklung parallelliegenden Kondensator von 5 nF für die Trägerfrequenz ein Resonanzkreis entsteht, dessen Resonanzwiderstand ein vielfaches des zu übertragenden Brückenwiderstandes von 4 KΩ ist, so daß praktisch keine Übertragungsverluste eintreten. Da eine möglichst konstante Trägerfrequenzspannung an der Brücke erwünscht ist, wird von der Anodenwechselspannung der Triode über eine Germaniumdiode eine Regelspannung gewonnen, die direkt von der Ausgangswechselspannung abhängt und durch Verschiebung des Steuergitterpotentials der Pentode für Spannungsstabilisierung sorgt.

Bei der gewählten Frequenz sind bereits kleine Kapazitätsunterschiede der DMS gegen Erde und die Kapazität des Kabels von Bedeutung. Es ist daher im Gerät ein von außen bedienbarer

kapazitiver Abgleich (C-Abgleich) angebracht, mit dem bei Nullstellung oder Eichung vor dem Meßvorgang Blind- und Wirkstrom im Brückenzweig kompensiert werden, um im Diagonalzweig Stromlosigkeit zu erreichen.

Die Trägerfrequenzverstärkerstufe wird durch die Röhren 2 u. 3 (Abb. 1 b) gebildet. Zur Aussiebung von 50 Hz Brummstörungen ist vor

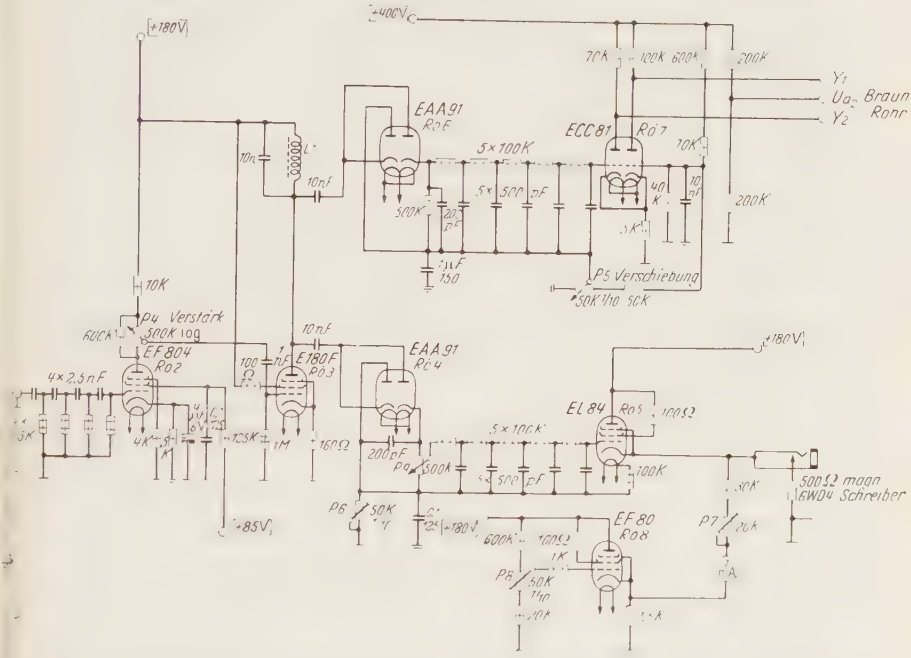


Abb. 1 b. Trägerfrequenzverstärker (Röhre 2 u. 3), Gleichrichter (Röhre 4 u. 6), Endstufe für Spannungsverstärkung (Röhre 7), mit Ausgang für BRAUNsches Rohr, Endstufe für Leistungsverstärkung (Röhre 5 u. 8) mit Ausgang für Meßinstrument (μ-Dehnung) und Magnetschreiber

die Röhre 2 ein Hochpaß geschaltet, der die Meßspannung bevorzugt passieren läßt. Im Außenwiderstand der Röhre 2 wird mit dem Potentiometer P 4 die Gittersteuerspannung für die folgende Röhre abgegriffen, damit ist eine Verstärkungsregelung möglich, die zur Anpassung der Anzeigeempfindlichkeit an den jeweils gewählten Dehnungsmeßbereich erforderlich ist.

Die Röhre 3 verstärkt infolge ihrer außergewöhnlich hohen Steilheit (etwa 16 mA/V) und ihres relativ großen Außenwiderstandes so hoch, daß die Gesamtverstärkung ausreichend ist. Der Außenwiderstand ist ein Resonanzkreis, der auf die Trägerfrequenz abgestimmt ist und eine Bandbreite von 400 Hz aufweist. Dies erreicht man durch entsprechende Festlegung der Spulengüte bei bekanntem Resonanzkreis-Kondensator.

Von der Anode der Röhre 3 wird die Anodenwechselspannung den Gleichrichtern (Röhre 4 u. 6) zugeführt. Die modulierte Trägerfrequenz wird jeweils in den Röhren 4 u. 6 gleichgerichtet. Ein nachfolgender Tiefpaß sperrt die Trägerfrequenz und ist nur für den Modulationsinhalt (Druckniveau und Pulswelle) durchlässig, der nun in die Spannungs- und Leistungsverstärkerstufe gegeben wird.

Für eine Anpassung der Schreibamplitude des Magnetschreibers an die des BRAUNschen Rohres wird die Steuerspannung der Leistungsstufe (Röhre 5) durch das Potentiometer P 9 regelbar gemacht.

Zur Überwindung der am Rußkymo auftretenden Reibungswiderstände des Zeigers erhält der Schreibstift eine durch den Regler P 6 einstellbare 50 Hz Brummspannung, die der Ausgangsspannung überlagert ist.

Die Ausgangsspannung der Leistungsverstärkerstufe (Röhre 5) wird durch ein als Spannungsmesser geschaltetes Milliamp.-Meter gemessen. Da die Röhre 5 zur unverzerrten Leistungsverstärkung einen Anfangsstrom benötigt, wird dem Spannungsmesser durch Röhre 8 eine Gegenspannung gegengeschaltet, und mit dem Potentiometer P 8 auf die Höhe der Anlaufspannung eingeregelt. Da der Quellwiderstand dieser Gegenspannung gegenüber dem Innenwiderstand des Spannungsmessers so niederohmig sein muß, daß bei voller Aussteuerung des Spannungsmessers nur eine unwesentliche Änderung der Gegenspannung auftritt, wurde eine Kathodenstufe verwendet, deren Ausgangswiderstand $1/S \approx 100\ \Omega$ beträgt. Um eine Ablesung am Instrument auch dann zu ermöglichen, wenn kein Magnetschreiber angeschlossen ist, wird durch Schaltbuchse ein Ersatzwiderstand von 500 Ω in den Ausgang gelegt.

Für das BRAUNsche Rohr ist zur Erzielung einer großen Bildschärfe eine symmetrische Ablenkung vorzuziehen. Die Ablenkspannung wird von der Röhre 7 erzeugt (Y 1, Y 2), deren zwei Anoden jeweils den gleichen Anteil der angekoppelten Signalspannung übernehmen. Der Anode 2 des BRAUNschen Rohres wird durch Spannungsteiler (Ua_2) die Ruhespannung der Signalplatten erteilt. Eine Verschiebung des Strahles in Ablenkrichtung erfolgt mit Potentiometer P 5.

Netzteil

Die Heizspannung aller besprochenen Röhren liefern die Regeltransformatoren 2 u. 3; sie arbeiten nach dem Prinzip der magnetischen Sättigung und stabilisieren Netzspannungsschwankungen von $\pm$ 10% (Abb. 1a). Die Anodenspannung wird über Vollweggleichrichtung gewonnen und nach L-C-Siebung einer üblichen elektronischen Regelschaltung zugeführt. Durch diese Art der Stabilisierung sind die Oberspannungen 85 V und 180 V von Netzspannungsschwankungen $\pm$ 20% unabhängig.

Neben dieser elektrischen Stabilisierung ist besonders auf konstante Temperaturverhältnisse zu achten. Am Druckabnehmer kompensieren sich infolge der Gegentaktschaltung Temperatureinflüsse, wenn sie beide Streifen gleichzeitig treffen; einseitige Erwärmung ist auf jeden Fall zu vermeiden, bei Verwendung von Wärmestrahlern über dem Versuchstier genügt Abdeckung des Druckabnehmers mit Pappe. Ebenso temperaturempfindlich sind auch die Vergleichswiderstände im Gerät. Widerstandsschwankungen ergaben sich daher besonders in der Anlaufzeit des Gerätes, in der sich die Innentemperatur sehr langsam auf etwa 70° C erhöht. Durch eingebauten Ventilator erreichten wir eine Verkürzung der Anlaufzeit auf 15—30 min. Im allgemeinen reicht diese Temperaturregulation aus. Bei erheblichen Schwankungen der Raumtemperatur (± 6° C) bewährte sich ein kleiner Thermostat (Abb. 2), in dem die beiden Vergleichswiderstände untergebracht wurden. Er besteht aus einem Hg-Mantel, um den eine Heizwicklung gelegt ist. Sie liegt in Reihe mit einer Glühbirne (4 V, 1,2W) und wird bei einer Hg-Temperatur von etwa 40° C durch Hg-Thermokontakt ausgeschaltet.

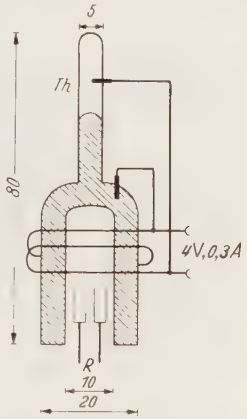


Abb. 2. Thermostat für Vergleichswiderstände (*R*.) Th: Thermokontakt, Abmessungen in Millimeter

Magnetschreiber

Das magnetische Schreibsystem arbeitet nach dem Prinzip eines permanent-dynamischen Lautsprechers, dessen Schwingspule einen Ohmschen Widerstand von 500 Ω besitzt und durch doppelte Zentrierspinnen geführt wird. Die Messung des dynamischen Systems ergab bei I I 13 mA eine Spulenverschiebung von 0,5 mm, die bei der von uns gewählten Übersetzung von 1:64 (Drehpunktabstand 5 mm) einen Schreibhub von 32 mm ergibt. Da bei Blutdruckschreibung der Schreibhub nur etwa 15 mm beträgt, kann auf eine besondere Dämpfungsvorrichtung verzichtet werden, wenn die bewegte Masse klein gehalten wird. Dies gilt insbesondere für die drehpunktfernen Zeigerteile; der Zeiger wurde deshalb aus sehr leichten miteinander verstrebten Halmen aus Grasstroh (⌀ 0,5—1 mm) hergestellt.

Druckabnehmer

Der Druckabnehmer für Blutdruckmessungen an Katzen hat die in Abb. 3 angegebenen Abmessungen. Die Blattfeder aus Bronzeblech ist fest in den Halteblock eingespannt, die Gefäßunterlage wird durch eine Rändelschraube so eingeklemmt, daß der Druckstift die Ränder der Gefäßrinne bei Biegung der Feder nicht berührt. Der untere Teil des

Druckstiftes ist zylinderförmig und so lang, daß er das unter normalem Innendruck stehende Gefäß mit ebener Fläche ($\varnothing \approx 0{,}8$ mm) um ungefähr die Hälfte seines Lumens eindrückt. Stromvolumenbestimmungen am isolierten Gefäß ergaben, daß eine solche Eindellung keine strömungswirksame Querschnittsänderung hervorruft, offenbar weicht

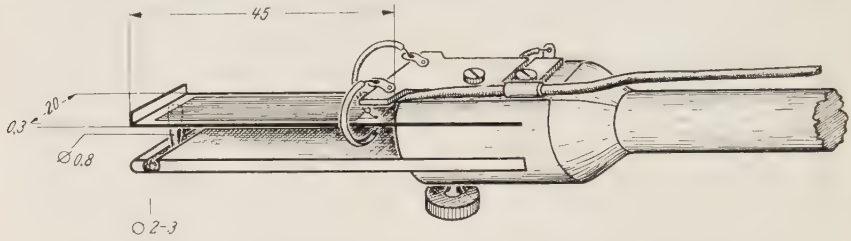


Abb. 3. Druckabnehmer für Katzen (A. carotis), Abmessungen in Millimeter

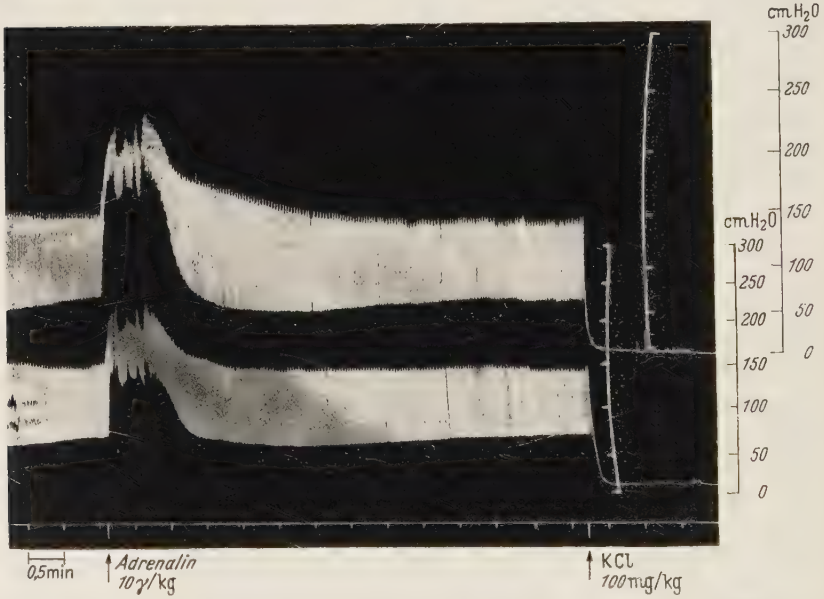


Abb. 4. Katze 3,8 kg (Urethan), Blutdruck nach 10 γ/kg Adrenalin, anschließend durch KCl Herzstillstand, untere Kurve: blutige Bd.-Schreibung aus re. A. carotis mit Federmanometer, obere Kurve: unblutige Bd.-Schreibung an li. A. carotis. Zeit: 0,5 min

das elastische Gefäß seitlich aus. Eine ebene Berührungsfläche zwischen Druckstift und Gefäß ist erforderlich, damit auch bei verschiedenen Eindrucktiefen, also bei Blutdruckschwankungen eine konstante Druckfläche erhalten bleibt. Der Druckstift ist fest unter die Feder gelötet, so daß bei Carotiden mit verschiedenen Durchmessern die anfängliche Eindrucktiefe von dem Richtwert (50%) abweicht. Diese Unterschiede

in der Ausgangslage beeinträchtigen den Meßvorgang nicht, weil bei der verwendeten Feder der Hub des Druckstiftes bei Blutdruckschwankungen nur sehr gering ist (50 cm $H_2O < 0{,}2$ mm).

Auf Unter- und Oberseite der Blattfeder wird je ein DMS geklebt und über Lötösen mit dem abführenden Kabel verbunden. Diese Anordnung ist durch stufenweise Belastung (bis 5 g) auf mechanische Linearität zu prüfen, die entsprechende lineare Verstärkung durch die Meßbrücke wird am Instrument in μ-Dehnung gemessen und mit den Ausschlägen des angeschlossenen Schreibsystems verglichen. Dann erst erfolgt die Druckeichung an einem isolierten Gefäßstück, für die Druckstufen 0—350 cm H_2O werden die zugehörigen am Instrument abgelesenen Dehnungswerte in einer graphischen Darstellung aufgetragen. Diese Kurve stellt die Eichkurve des Druckabnehmers für alle weiteren Versuche dar.

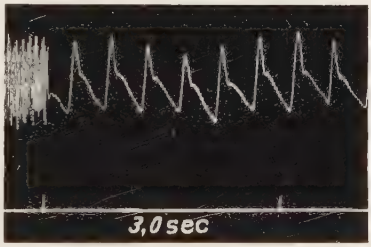


Abb. 5.
Pulskurve, mit Magnetschreiber registriert

Die praktische Anwendung verläuft dann folgendermaßen: Die freigelegte A. carotis wird unter leichtem Anheben der Blattfeder in die Gefäßrinne gelegt, so daß der Stempel einwandfrei in ihr pulsiert. Sodann wird die Carotis beiderseits des Abnehmers abgeklemmt; damit ist am Druckabnehmer der Druck O hergestellt. Mit dem R-Abgleich der Meßbrücke regelt man dann den aus der Eichkurve für den Druck O abgelesenen Dehnungswert am Instrument ein. Nach anschließender Abnahme der Klemmen ist dann mit der Dehnungsanzeige des Instrumentes der absolute Druck aus der Eichkurve direkt ablesbar. Wir haben unsere Anordnung am selben Versuchstier geprüft, indem wir an der linken Carotis den Blutdruck unblutig schrieben, während wir ihn rechts mit einem von Schlosser (1956) entwickelten Federmanometer registrierten (Abb. 4). Die vom Magnetschreiber aufgezeichnete Pulskurve ist in Abb. 5 wiedergegeben, die Incisur tritt deutlich hervor, ebenso die dem Schreibsystem aufgelegte Grundvibration von 50 Hz.

Dynamische Prüfung

Da mit der gleichzeitigen Sichtbarmachung der Druckabläufe am Braunschen Rohr eine völlig trägheitslose Registriermöglichkeit der Pulskurve gegeben ist, und die Bandbreite der Meßbrücke etwa 400 Hz beträgt, war eine dynamische Prüfung des Druckabnehmers erforderlich. Hierbei erübrigt sich die Bestimmung des Dämpfungsfaktors, weil durch die direkte mechanische Kopplung des Druckabnehmers mit dem Gefäßinnendruck keine freischwingenden Teilsysteme vorhanden sind. Zur

Bestimmung der Eigenfrequenz erregten wir die Blattfeder über Luftankopplung mit Schalldrucken, die von einem Tongenerator mit Druckkammersystem erzeugt wurden. Die tonsynchronen Schwingungen der Feder wurden am BRAUNschen Rohr bis zur Eigenfrequenz von 67 Hz amplitudengetreu widergegeben. Demnach reicht der Frequenzbereich des oben beschriebenen Druckabnehmers für die unverzerrte Wiedergabe der Hauptschwingung des zentralen arteriellen Pulses, dessen Frequenz 25 Hz nicht überschreitet, völlig aus. Dagegen ist für die Wiedergabe der höheren Frequenzanteile (Vorschwingung, Anfangsschwingung, Incisur) die oberhalb 60 Hz liegen, die Eigenfrequenz des Druckabnehmers

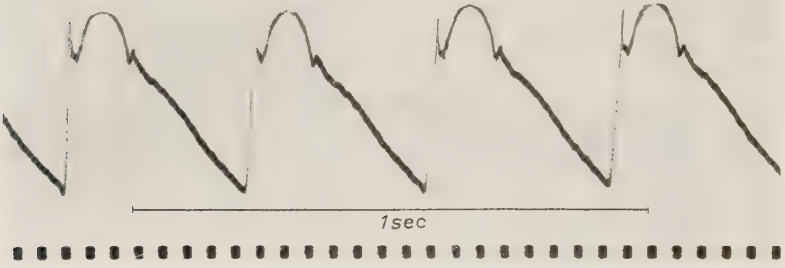


Abb. 6. Pulskurve mit BRAUNschem Rohr auf Papierfilm registriert

zu erhöhen. Die dazu notwendige Verstärkung der Blattfeder ist mit Empfindlichkeitsabnahme verbunden, welche durch Verstärkerreserve der Meßbrücke nicht in dem gewünschten Umfang kompensiert wird. Eine Steigerung der Empfindlichkeit des Druckabnehmers läßt sich nun entweder elektrisch oder mechanisch erreichen. Genau eine Verdopplung erhält man, wenn man als Vergleichswiderstände, die sich normalerweise im Gerät befinden, ebenfalls DMS verwendet und sie in „Doppel-Gegentaktschaltung" auf die Blattfeder klebt. Es entfällt dann allerdings die Eichmöglichkeit, d. h. die tatsächlich auftretende Dehnung ist am Instrument nicht mehr ablesbar. Mechanisch läßt sich die wirksame Kraft durch Vergrößerung der Druckfläche (Kraft = Fläche · Druck) erhöhen, indem man sie zu einer 5 mm langen Schneide verlängert. Beide Anordnungen sind von uns erprobt, mit der letzten ist die in Abb. 6 wiedergegebene Pulskurve oscillographisch registriert. Die dynamische Prüfung ergab eine Eigenfrequenz von 135 Hz. Wie die Abbildung zeigt, werden Anfangsschwingung und Incisur einwandfrei übertragen.

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur unblutigen Blutdruckmessung am nicht-eröffneten freigelegten Gefäß beschrieben. Dabei wird die Gefäßmembran durch Blattfederdruck entspannt, so daß eine feste Kopplung

zwischen Innendruck und Federdruck hergestellt ist. Die mechanischen Biegungen der Feder werden durch Dehnungsmeßstreifen in Brückenschaltung in Spannungsänderungen umgewandelt, mit denen einerseits ein magnetisches Schreibsystem und andererseits eine Braunsche Röhre ausgesteuert werden. Die Anordnung ermöglicht somit eine Direktschreibung des Blutdrucks auf Rußkymo und eine Sichtbarmachung der Pulskurve auf Braunschem Rohr.

Literatur

Behrens, B., u. G. W. Jacobi: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 450 (1949); **215**, 409 (1952). — Hamacher, J., u. W. Vater: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 163 (1954). — Lullies, H.: Pflügers Arch. **241**, 354 (1939). — Schlosser, L.: In Vorbereitung. — Wick, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 348 (1953).

Dr. H. F. Benthe, Kiel, Pharmakol. Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 316–330 (1956)

Aus dem Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin (Direktor: Prof. Dr. Dr. Enno Freerksen)

Serumeiweißuntersuchungen mit Papierelektrophorese beim gesunden Meerschweinchen und nach Infektion mit virulenten und virulenzgeschwächten, humanen Tuberkelbakterien

(I. Mitteilung)

Von

Hans-Hugo Rabe und Herbert Bürger

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Mai 1956)

Bei der Vielzahl der vorliegenden Arbeiten über die Serumfraktionierung durch Papierelektrophorese sind Untersuchungen am Serum des Meerschweinchens selten. Es liegen Arbeiten von Deutsch und Edsall über normale Bluteiweißwerte, ferner von Gjessing u. Mitarb. über das Pherogramm beim versehrten und von Weymer u. Mitarb. sowie Angulo-Ortega beim tuberkulös infizierten Meerschweinchen vor.

Danach sind in der Literatur an Normalwerten angegeben:

Autor:	Albumin %	α_1-Globulin %	α_2-Globulin %	β-Globulin %	γ-Globulin %	Fibrinogen %
Deutsch . . . (3 Tiere)	54,6 ± 0,9		22,9 ± 0,6	8,8 ±0,1	5,6 ±0,3	8,1 ±0,4
Edsall	55,8		14,5	8,2	21,5	
Gjessing . . . (5 Tiere)	30—54	5—12	9—15	4—12	21—36	
Angulo-Ortega	54,5	6,3	16,98	10,69	11,4	

Der Vergleich der Tabelle zeigt die erheblichen Schwankungen schon im Bereich der „Normalwerte" bei den verschiedenen Autoren. Sie erklären sich vorwiegend aus der Verschiedenartigkeit der Methodik. Die Werte von Deutsch, Edsall und Gjessing wurden mit der Tiselius-Apparatur gewonnen. Weymer u. Mitarb. bestimmten die Gesamtproteine, Albumin- und Globulinfraktionen und den Albumin-Globulin-Quotienten mit der Biuret-Methode von Weichselbaum.

Angulo-Ortega untersuchte mit der Papierelektrophorese nach Grassmann-Hannig.

Die Arbeiten von Weymer u. Mitarb. und Angulo-Ortega stellen als einzige uns vorliegende Untersuchungen Veränderungen des Serumeiweißbildes bei experimenteller Meerschweinchentuberkulose dar.

Ausgehend von der Wichtigkeit des Tierversuches am tuberkulös infizierten Meerschweinchen sollten durch unsere Arbeit 3 Hauptfragen geklärt werden:

1. Kann man von normalen Ausgangswerten der Serumeiweißfraktionen bei gesunden Meerschweinchen sprechen und bleiben diese nach wiederholten Herzpunktionen konstant?

2. Wie sieht das Verlaufspherogramm des Meerschweinchens nach Infektion mit virulenzgeschwächtem, humanem Mycobacterium tuberculosis aus und welche Deutung läßt es zu?

3. Wie verändern sich die Serumeiweißkörper beim Meerschweinchen nach Infektion mit virulentem, humanem Mycobacterium tuberculosis?

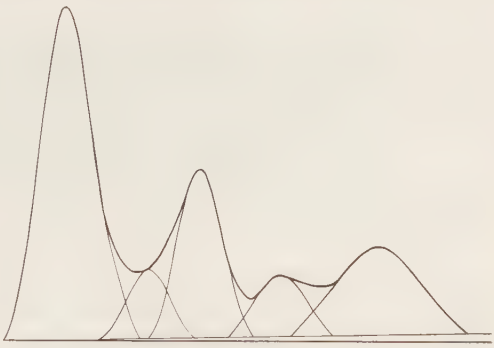


Abb. 1.

Aufgelöste Gradientenkurve von Meerschweinchen-Serum

Material und Methodik

Das Tiermaterial setzte sich aus 74 Meerschweinchen beiderlei Geschlechts zusammen, die streng getrennt waren und ein Durchschnittsgewicht von 400—550 g aufwiesen. Haltung und Fütterung waren möglichst gleichbleibend.

Serumgewinnung: Das Blut wurde durch Herzpunktion, das hämoglobinfreie Serum in typischer Weise gewonnen.

Während der Zeit der Untersuchungen traten keine manifesten, nichttuberkulösen Erkrankungen unter unseren Tieren auf. Lediglich im Anschluß an die Herzpunktionen verstarben 6 Tiere im Kollaps nach Hämopericard.

Zur Anwendung gelangte des „Elphor"-Gerät nach Grassmann-Hannig der Firma Bender & Hobein. Puffer nach Grassmann vom p_H 8,6 und der Ionenstärke 0,1. Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043a. 0,008 ml Serum wurde mit Spezialpipette aufgetragen. Die Laufzeit betrug 20 Std bei 110 Volt Spannung und konstanter Temperatur von 18° C.

Nach Lufttrocknung und Fixieren im Trockenschrank bei 100° C, färbten wir die Streifen mit Amidoschwarz 10 B in einer Lösung von Methanol und Eisessig 30 min unter häufigem Umschwenken des Färbebades.

Sorgfältige Entfärbung in typischer Weise (4 Std) und Einlegen der Streifen in Brom-Naphthalin-Lösung (Brechungsindex 1,51). Auswertung mit dem Photometer der Firma Bender & Hobein (Gelbfilter Nr. 590). Rechnerische und zeichnerische Auflösung der Gradientenkurven in Gausssche Kurven und Ausmessen mit Planimeter (Abb. 1).

Erst nach einer Laufzeit von 20 Std lag eine ausreichende Trennung von Albumin und α_1-Globulin vor.

Bei allen Diagrammen ließ sich bereits nach einer Laufzeit von 12 und 14 Std eine asymmetrische α_2-Fraktion nachweisen; bei mehreren Kurven wurde nach einer Laufzeit von 20 Std die Abgrenzung einer Unterfraktion zwischen α_1- und α_2-Globulin möglich, wie sie auch von Deutsch bereits beschrieben wurde, der ja das extrem hohe α_3-Globulin als spezifisch für Meerschweinchenseren ansah.

Weiterhin grenzen sich im Bereich des β-Globulins zwei meist gleichhohe Gipfel ab (Abb. 2).

Die ausführliche Beschreibung der Methodik erscheint notwendig, da Vergleiche mit anderen Untersuchungsergebnissen nur bei gleichartiger Technik möglich sind.

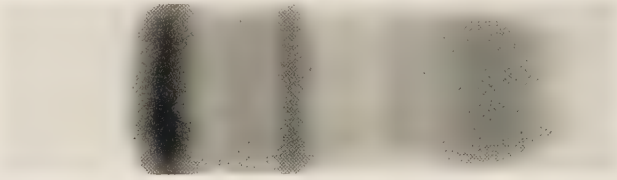


Abb. 2. Elektrophorese-Streifen von Meerschweinchenserum, der den großen Anteil des α_2-Globulins und die Aufspaltung der β-Fraktion erkennen läßt

Wichtig ist im gleichen Zusammenhang, die Durchführung der Elektrophorese vom Auftragen des Serums bis zur Auswertung und Kurvenanalyse möglichst in der Hand von ein bis zwei Untersuchern zu belassen. Wir glauben, daß auch dadurch die methodische Fehlerbreite eingeengt werden kann.

Die neueren Arbeiten von Grassmann u. Hannig, Pieper u. Molinski, Fuchs u. Flach, Riva u. Martini, Wuhrmann u. a. machen in gleicher Weise die Wichtigkeit genauer methodischer Angaben bei der Papierelektrophorese deutlich.

Um bei der Auswertung der Serumeiweißveränderungen in den unterteilten Tiergruppen kritisch zu verfahren, errechneten wir die Mittelwerte, ihre quadratischen Streuungen und bedienten uns zur Feststellung signifikanter Abweichungen der τ-Funktion nach Gebelein u. Heite.

Hiernach besteht zwischen zwei Mittelwerten M_1 und M_2 und ihren jeweiligen Streuwerten σ_1 und σ_2 dann eine signifikante Differenz, wenn der aus ihnen errechnete Quotient $Q = \dfrac{M_2 - M_1}{\sqrt{\dfrac{\sigma_1^2}{n_2} + \dfrac{\sigma_2^2}{n_1}}}$ größer ist als $3 + \dfrac{10}{n_1 - n_2}$.

(n = Zahl der Beobachtungen.)

Ergebnisse

1. Serumuntersuchungen an gesunden Meerschweinchen

Wir berichten über 125 Einzeluntersuchungen am Serum von 45 gesunden Meerschweinchen. 20 Tiere wurden laufend, in Abständen von 28 Tagen, über einen Zeitraum von 20 Wochen kontrolliert. 4 Tiere, die nach Herzpunktion verstarben, ersetzten wir durch andere, die gleichviele Herzpunktionen überstanden hatten. Es ergaben sich 16 vollständige Verlaufsserien.

Tabelle 1. *Gruppenpherogramm*

Tag	Zahl der Untersuchungen	Albumin %	α_1-Globulin %	α_2-Globulin %	β-Globulin %	γ-Globulin %
1.	45	46,3	6,6	22,3	7,6	17,2
		±2,78	±1,79	±2,45	±1,46	±2,71
28.	20	45,5	6,7	22,2	8,4	17,2
		±2,24	±1,73	±2,05	±1,86	±1,71
56.	20	44,9	7,1	21,4	10,0	16,6
		±2,55	±1,64	±2,05	±2,30	±2,27
84.	20	46,6	7,5	19,3	10,1	16,5
		±2,60	±1,66	±2,06	±2,30	±2,05
140.	20	45,7	6,4	19,3	10,6	18,0
		±2,61	±1,26	±2,11	±1,81	±2,10

Die errechneten Mittelwerte der Proteinfraktionen und ihre quadratischen Streuungen erbrachten über einen Zeitraum von 20 Wochen eine Konstanz dieser Werte, mit unbedeutenden, vielleicht methodisch bedingten Abweichungen.

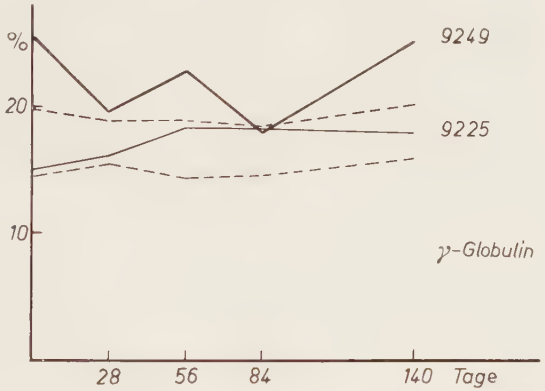


Abb. 3. Streubereich für γ-Globulin bei gesunden Meerschweinchen mit Einzelverlaufskurven. - - - Grenzen des Streubereichs. ——— Tier Nr. 9225 zeigt normalen Verlauf. ——— Tier Nr. 9249 mit abweichendem Verlaufspherogramm

Lediglich die α_2-Globuline zeigen eine geringe Verminderung, die β-Globuline eine stetige, langsame Vermehrung.

Es besteht die Möglichkeit, daß diese Veränderungen durch den wiederholten, unspezifischen Reiz bei den mehrfachen Herzpunktionen zu erklären sind.

Die Veränderungen der β-Globuline mit langsamen Anstieg werden in der Arbeit von Scheurlen über die Erzeugung einer Dysproteinämie mit Injektionen von Casein-Soda-Lösungen bei Mäusen beschrieben. Den Abfall des α_2-Globulins und die Zunahme von β-Globulin erkennt man auch bei den Verlaufspherogrammen an 15 gesunden Meerschweinchen unter Rimifon in der Arbeit von Angulo-Ortega.

Pherogramm des Einzeltieres. Bei Darstellung der Verlaufkurven für das Einzeltier machen sich dagegen deutlichere, individuelle Schwankungen der Serumfraktionen bemerkbar. Sie liegen jedoch meist im Bereich der quadratischen Streuungsbreite.

In Abb. 4 werden diese Abweichungen am Beispiel des γ-Globulins aufgezeigt, da diese Fraktion beim Tier besonderen Schwankungen unterliegt (Edsall, Sharp u. Mitarb., Scheurlen). Lediglich das Tier Nr. 9249 zeigt ein völlig atypisches Verlaufsbild.

Diskussion. Beim Vergleich unserer Ergebnisse am Serum gesunder Meerschweinchen mit den Angaben von Deutsch, Edsall und Angulo-Ortega liegen unsere Werte im Albuminbereich wesentlich niedriger; sie fallen aber in den von Gjessing angegebenen Schwankungsbereich und nähern sich mehr den dort gefundenen Maximalwerten. Die Unterschiede bei den α- und β-Globulinen sind nicht so erheblich. Unser Durchschnittswert für die γ-Globuline liegt mit 17,2% zwischen den von Edsall und Angulo-Ortega angegebenen Werten.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, sind die eigenen Untersuchungen mit den Werten der genannten Autoren, auch mit den Ergebnissen von Angulo-Ortega, nur bedingt vergleichbar, da sie in der Methode, bei Angulo-Ortega in Puffer, Papier, Laufzeit und Auswertmethode, abweichen.

Wir nehmen zur Ausgangsfrage Stellung: Wir fanden bei gesunden Versuchstieren nahezu konstante Mittelwerte und Streubereiche nach mehrfach wiederholten Serumuntersuchungen über 20 Wochen. Die Einzeltiere zeigten Schwankungen um einen individuellen Mittelwert. Die Ergebnisse sind unseres Erachtens als Kontrollwerte gegenüber infizierten Tieren brauchbar.

Für besonders wichtig halten wir jedoch, daß die Untersuchungen an einem möglichst großen Tierkollektiv mit zahlreichen und häufigen Kontrollen durchgeführt werden, wie sie auch von Wunderly bei Serumuntersuchungen und von O. Günther für immunchemische Versuche gefordert werden.

Auch bei unseren Untersuchungen ließ sich wegen der relativ geringen Tierzahl der statistische Fehler der zu kleinen Zahl nicht ausschalten. Die Ergebnisse der Serumfraktionierung an anderen Tieren ergeben nach den Zusammenstellungen von Wunderly, Antweiler, Boguth u. a. eher größere Schwankungsbereiche bei gesunden Tieren.

2. Untersuchungen an Meerschweinchen nach Infektion mit virulenzgeschwächtem, humanem Mycobacterium tuberculosis

Zur Frage der Verlaufspherogramme beim Meerschweinchen nach Infektion mit virulenzgeschwächten, humanen Tuberkelbakterien untersuchten wir das Serum von 24 Tieren (insgesamt 139 Einzelkontrollen).

Die Meerschweinchen waren mit 1 cm³, 0,01 mg/cm³ des virulenzgeschwächten Stammes Ketzner 11857, Kolonie 3, enthaltend, subcutan in der rechten Leistenbeuge infiziert worden (Labor Dr. G. Meißner). Bei 12 dieser Tiere erfolgten zur Kontrolle Tuberkulin-Testungen nach MENDEL-MANTOUX mit 500 TE des gereinigten GT „Höchst". Alle wiesen bereits nach einem Intervall von 2 Wochen deutlich positive Cutanreaktionen auf. Um einen Einfluß dieser hohen Tuberkulindosen auf das Pherogramm auszuschließen, wurden 12 Tiere der Untersuchungsgruppe nicht getestet. Im Bluteiweißbild zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen diesen beiden Untergruppen. Die Serumuntersuchungen nahmen wir wieder in 28tägigen Abständen vor; lediglich die erste Herzpunktion erfolgte bereits 14 Tage nach der Infektion. Wir erhielten 23 vollständige Verlaufsserien über einen Zeitraum von 22 Wochen.

Bei den 2 nach Herzpunktionen verstorbenen Tieren ergab die Sektion (ROSENFELD) folgenden, makroskopischen Befund:

Meerschweinchen Nr. 1714: Gestorben am 15. Tage. Hämatothorax. Leistenlymphknoten beiderseits gerötet und deutlich vergrößert. (Kulturell BK nachgewiesen.) Beckenlymphknoten wenig, paratracheale mäßig vergrößert.

Meerschweinchen Nr. 1716: Verstorben nach Herzpunktion am 154. Tage. Injektionsstelle verkäst. (Kulturell BK nachgewiesen.) In der rechten Lunge einige glasige Stippchen ohne Verkäsung.

Tabelle 2. *Gruppenpherogramm*

Tag	Zahl der Untersuchungen	Albumin %	α_1-Globulin %	α_2-Globulin %	β-Globulin %	γ-Globulin %
14.	24	44,8	6,8	20,6	9,0	18,8
		±3,24	±1,70	±2,16	±2,19	±3,49
42.	23	45,2	6,1	19,6	8,4	20,7
		±3,38	±1,30	±2,35	±2,37	±3,44
70.	23	47,1	6,9	17,4	10,0	18,6
		±3,72	±1,42	±2,45	±2,33	±3,96
84.	23	48,4	5,4	19,8	9,3	17,1
		±3,54	±1,65	±2,33	±2,24	±3,09
128.	23	47,0	5,4	18,9	9,0	19,7
		±3,08	±1,33	±2,39	±2,01	±3,52
154.	23	44,8	5,5	19,6	9,1	21,0
		±3,24	±1,52	±2,45	±2,14	±2,99

Wir errechneten wiederum die Mittelwerte der einzelnen Fraktionen und ihre quadratischen Streuungen.

Das Ergebnis läßt im Serum der Tiere nach der ersten Punktion, am 14. Tage post infektionem, einen geringen Albuminabfall erkennen. Vom 42. bis zum 128. Tage liegen die Albumin-Mittelwerte im Niveau des normalen oder gering darüber, um am 154. wieder auf die untere Grenze des normalen Streubereichs zuzulaufen.

Die α- und β-Globulin-Veränderungen erscheinen wenig charakteristisch, wenn sich auch die schon bei den gesunden Tieren beschriebene β-Globulin-Vermehrung im Verlauf der Serie andeutet.

Bei den γ-Globulin-Mittelwerten fiel in den ersten Wochen ein Anstieg auf, der am 42. Tage sein Maximum erreichte. Danach folgten bis

zum 84. Tage Rückgang auf normale Werte und am 128. und 154. ein erneuter leichter Anstieg. Die Abweichungen der γ-Globuline am 42. und 154. Tage müssen in dieser Gruppe als statistisch signifikant angesehen werden.

Pherogramm des Einzeltieres. Bei der Betrachtung der Einzelverlaufskurven zeigten drei Tiere einen kurzfristigen, initialen γ-Globulin-Abfall.

13 Tiere wiesen einen vorübergehenden γ-Globulin-Gipfel mit Maximum zwischen dem 14. und 70. Tage post infektionem auf (Abb. 4). Bei

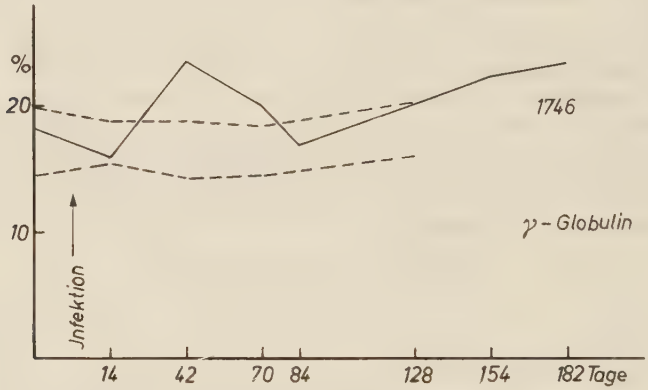


Abb. 4. Verhalten der γ-Globuline im Meerschweinchenserum nach Infektion mit virulenzgeschwächten, humanen Tuberkelbakterien. - - - - Grenzen des Streubereichs der Normalwerte.
——— Einzelverlaufskurve des Meerschweinchens Nr. 1746

11 Meerschweinchen ließ sich am 128. und 154. Tage eine γ-Globulin-Vermehrung nachweisen. 2 Tiere verließen den Normalbereich nicht.

Diese γ-Abweichungen zu verschiedenen Zeitpunkten finden rechnerisch ihren Niederschlag in der bemerkenswerten Zunahme der quadratischen Streuung der γ-Globulin-Mittelwerte. Die Schwankungen der Albumine verlaufen im allgemeinen gegensinnig; jedoch sind sie in relativen Werten gerechnet, auch nicht so erheblich wie die der γ-Globulin-Fraktion.

Diskussion. Die Verlaufspherogramme mit den anscheinend typischen γ-Gipfeln beim Meerschweinchen nach Infektion mit virulenz-geschwächten, humanen Tuberkelbakterien stellen die Frage nach der Ursache dieser Globulin-Veränderungen zur Diskussion. Es scheint berechtigt, die von uns dargestellten Abweichungen der γ-Fraktion und der Albumine als Ausdruck einer Dysproteinämie aufzufassen, wie sie, nach schneller Überwindung eines akuten Stadiums, im Konstellationstyp der subakut-chronischen, mit Proliferation des Mesenchyms einhergehenden Entzündung entspricht. (Wuhrmann, Wunderly, Jahnke u. Scholtan beim Menschen, Boguth und Scheurlen beim Tier.)

Scheurlen glaubt bei der unspezifischen Entzündung einen Zusammenhang zwischen den γ-Globulin-Veränderungen und der Reaktionsfähigkeit der Eiweißbildungsstätten im aktiven Mesenchym zu sehen. Bei einem heftigen Eingriff in einen nicht vorbehandelten Organismus tritt seiner Meinung nach eine starke Depression der γ-Globuline ein. „Ist der Eingriff weniger schwer oder die Reaktionslage des Organismus durch verschiedene Faktoren, wie z. B. Vorbehandlung, verändert oder umgestimmt, so zeigen die γ-Globuline einen Anstieg." Mehr als bei den anderen Eiweißfraktionen sollen hier Regulationsvorgänge eine Rolle spielen. Letterer u. Schneider sprechen von Regulationen des Organismus, die sich im Bluteiweißbild manifestieren und auch morphologisch hervortreten. Sie werden als Zeichen einer Aktivierung der für den Bluteiweißumsatz tätigen Organe gedeutet.

Das Auftreten dieser Reaktionskonstellationen wird bei unseren Untersuchungen in einer, seltener in zwei Phasen beobachtet. Sie treten beim Einzeltier zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion auf, am häufigsten jedoch am 42. Tage.

Kracht u. Meissner fanden bei der Zusammenstellung pathologisch-anatomischer Befunde von Meerschweinchen nach Infektion mit INH-resistenten, virulenzgeschwächten Tuberkelbakterien das Maximum des Organbefalls und der Befallsindices zwischen dem 40. und 60. Tag nach der Infektion. Danach zeigte sich ein allmählicher Rückgang der Veränderungen. Es handelte sich vorwiegend um granulierende Gewebsprozesse. In der Leber wurden häufig Reticulumzellknötchen gefunden, die man nach Hamperl als unspezifische Gewebsreaktion auf die schwache Toxinwirkung virulenzgeschwächter Mycobakterien auffaßte, wie überhaupt unspezifische Gewebsreaktionen für Organveränderungen nach Infektion mit virulenzgeschwächten Tuberkelbakterien kennzeichnend sind.

Das Bluteiweißbild kann somit zur Beurteilung der Auseinandersetzung zwischen Meerschweinchenorganismus und Infektion mit virulenzgeschwächten Tuberkelbakterien herangezogen werden. Von der individuellen Resistenzlage erscheint es abhängig, zu welchem Zeitpunkt die Reaktion im Pherogramm manifest wird, und wann das Gleichgewicht zwischen Noxe und Organismus (Felder) wiederhergestellt ist. Eine Aussage über den Zusammenhang der γ-Globulin-Vermehrung im Krankheitsverlauf mit Schwankungen des Antikörpertiters und der Immunitätslage ist aus diesen Untersuchungen ohne parallel verlaufende, immunchemische Kontrollen unseres Erachtens nicht möglich.

3. Serumeiweißuntersuchungen an Meerschweinchen nach Infektion mit virulenten, humanen Tuberkelbakterien

Wir führten bei 30 Meerschweinchen Serumeiweißuntersuchungen in 28tägigen Abständen nach Infektion mit Mycobacterium tuberculosis humanus 10627/54, Hohn, Resistenz-Kontrolle vom 28. 10. 1954, 0,001 mg/cm³ durch. Die Tiere wurden mit 1 cm³ subcutan in der rechten Leistenbeuge infiziert (Labor Dr. G. Meissner).

Das Pherogramm dieser Meerschweinchen wurde jeweils bis zum Tode oder bei den überlebenden in geschlossenen Serien bis zum 210. Tage nach der Infektion verfolgt (insgesamt 175 Einzeluntersuchungen).

Die Berechnung der Mittelwerte und ihrer quadratischen Streuungen ergab einen Albuminabfall, am stärksten zwischen dem 14. und dem 42. Tag, der am 154. sein Minimum erreichte.

Tabelle 3. *Gruppenpherogramm*

Tag	Zahl der Untersuchungen	Albumin %	α_1-Globulin %	α_2-Globulin %	β-Globulin %	γ-Globulin %
14.	30	45,0	7,4	19,1	10,1	18,4
		±4,53	±1,86	±2,01	±2,44	±3,66
42.	30	37,4	7,8	18,7	10,9	25,2
		±4,47	±1,60	±2,19	±2,81	±4,07
70.	27	39,3	8,6	17,4	10,1	24,6
		±3,17	±1,55	±2,49	±1,86	±3,84
98.	26	37,4	8,7	18,2	9,7	26,0
		±3,00	±1,80	±1,82	±1,97	±3,17
126.	22	35,9	7,7	18,2	9,6	28,6
		±3,51	±2,01	±2,43	±2,21	±4,57
154.	20	34,5	7,9	16,9	10,5	30,2
		±3,39	±2,05	±2,26	±2,93	±4,59
182.	13	34,6	8,5	17,0	10,7	29,2
		±3,37	±1,74	±2,04	±1,85	±4,82
210.	7	38,1	8,2	15,5	13,5	24,7
		±4,69	±0,69	±1,65	±2,02	±4,48

Die α-Globuline zeigen im Vergleich mit den Kontrolltieren im gleichen Zeitraum keine verwertbaren Abweichungen, obgleich gegen Ende der Untersuchungsreihe ein stärkerer Abfall des α_2-Globulins auffällt. Die β-Globuline steigen ähnlich wie bei den Kontrollen leicht an.

Bemerkenswert und eindeutig ist die kontinuierliche Vermehrung der γ-Globuline bis zum 154. Tag nach der Infektion. Am 182. und 210. Tag lebten nur noch 13 bzw. 7 Meerschweinchen, deren Serum untersucht werden konnte. Durch den Wegfall der Tiere mit den schwersten γ-Globulin-Veränderungen sinken die Mittelwerte wieder ab. Die Abweichungen der Albumin- und γ-Globulin-Werte sind vom 42. Tage an signifikant.

Pherogramm beim Einzeltier. Das Bild der Verlaufskurven beim Einzeltier ergibt für Albumin und γ-Globulin in 24 Fällen extreme Abweichungen, in 6 Fällen kommt es dabei zum Überschneiden beider Kurvenzüge kurz vor dem Tode (Abb. 5).

Das Auftreten dieser Endkonstellationen weist zeitlich starke Unterschiede auf, die unseres Erachtens durch die individuelle Resistenzlage der Tiere bedingt sind. In der Statistik werden diese Zeitunterschiede durch eine Zunahme der Streuungsbreite bei den Albuminen und den γ-Globulinen bis fast auf das Doppelte wiedergegeben.

5 Meerschweinchen zeigten einen initialen Albuminabfall und γ-Globulin-Anstieg bis zum 42. Tag und hielten das erreichte Niveau über die Zeit unserer Beobachtung (Abb. 6).

Als bemerkenswerte Ausnahme kann das Pherogramm des Meerschweinchens Nr. 1782 beschrieben werden (Abb. 7).

Es zeigt, wie aus dem Diagramm ersichtlich, Veränderungen seiner Albumin- und γ-Globulin-Werte, wie wir sie nach Infektion mit virulenzgeschwächten Tuberkelbakterien dargestellt haben.

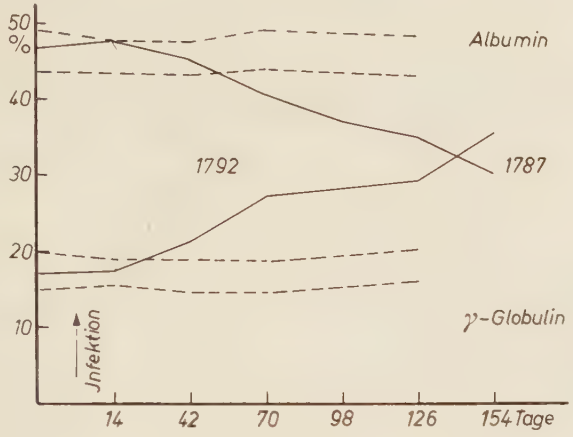


Abb. 5. Einzelverlaufkurven für Albumin und γ-Globulin nach Infektion mit virulenten, humanen Tuberkelbakterien. - - - - Grenzen des Streubereichs der gesunden Tiere

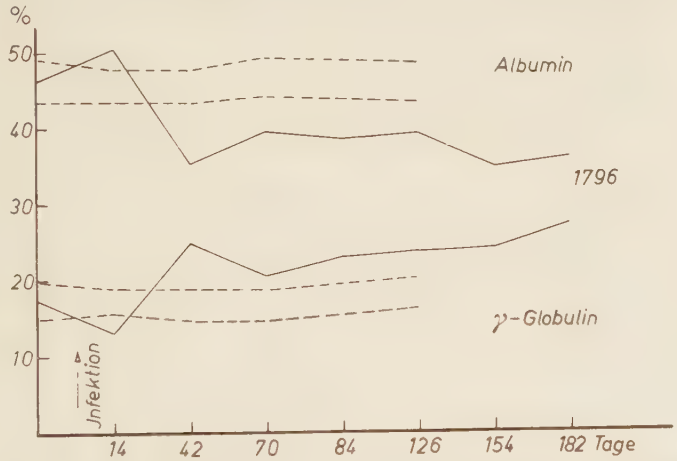


Abb. 6. Einzelverlaufskurve für Albumin und γ-Globulin nach Infektion mit virulenten, humanen Tuberkelbakterien. - - - - Grenzen des Streubereichs der Kontrolltiere

7 Tiere dieser Gruppe wiesen in den Einzelverlaufskurven nach der Punktion am 14. Tag p. i. einen initialen Abfall des γ-Globulins auf.

Die Überlebensdauer der einzelnen Meerschweinchen lag im Mittel bei 176 Tagen (Abb. 8).

Diskussion. Pathologisch-anatomischer Befund und Serumeiweißveränderungen: Zur Frage der pathologisch-anatomischen Ursachen der

Serumeiweißveränderungen bei den Meerschweinchen dieser Gruppe geben wir zusammengefaßt die Sektionsprotokolle wieder (ROSENFELD).

Lunge. Bei allen 29 bislang verstorbenen Tieren zeigten sich ausgedehnte, feine bis grobe, teilweise konfluierende, meist verkäste Herde.

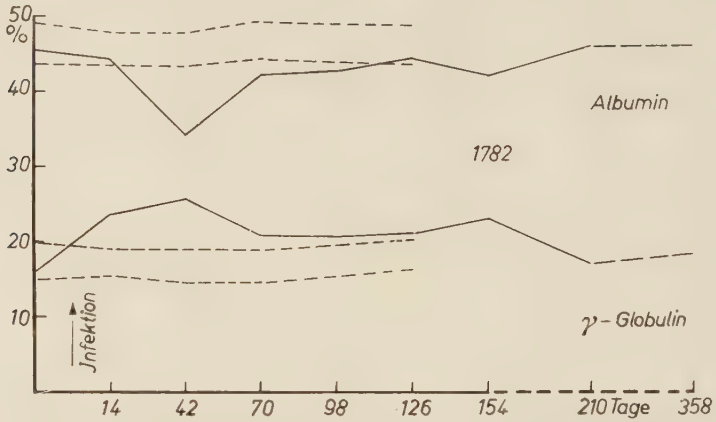


Abb. 7. Atypische Einzelverlaufskurve nach Infektion mit virulenten, humanen Tuberkelbakterien. - - - - Grenzen des Streubereichs der gesunden Tiere

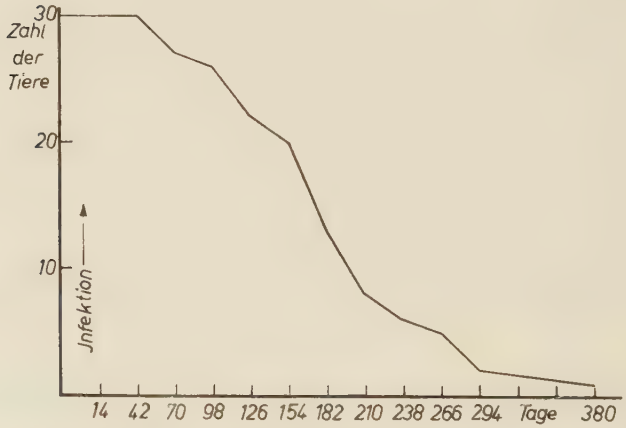


Abb. 8. Überlebensdauer von Meerschweinchen nach Infektion mit virulenten, humanen Tuberkelbakterien

Bei 6 Tieren fanden sich Kavernen verschiedener Größe, in einem Falle insgesamt 6 bis zu Kirschkerngröße.

Leber. Bei 20 Tieren war die Leber stark vergrößert, teilweise derb und höckerig, von zahlreichen Herden durchsetzt. Die übrigen Tiere wiesen ebenfalls ausgedehnte Herdbildungen in der Leber auf, jedoch ohne die makroskopischen Zeichen einer typischen Cirrhose.

Milz. In 27 Fällen Vergrößerung des Organs um das 2—5fache des Normalmaßes. In jedem Fall war sie durchsetzt von vielen, zum großen Teil verkästen Herden.

Lymphknoten. Bei allen Tieren war Vergrößerung und Verkäsung nachweisbar.

Eine Betrachtung der Verlaufsserien nach Infektion mit virulenten Tuberkelbakterien im Vergleich zu den Sektionsbefunden der verstorbenen Tiere erlaubt folgende Schlüsse: Die kontinuierliche Albuminverminderung bei gleichzeitigem steilen Anstieg der γ-Globuline ist vorwiegend auf die schwersten Veränderungen in Leber und Milz im Sinne der hypertrophischen Cirrhose und der tuberkulotoxischen Degeneration zu werten.

Luetscher beschrieb zuerst bei der Lebercirrhose des Menschen als Hauptveränderungen des Elektrophoresediagramms Albuminverminderung und γ-Globulinvermehrung. In späteren Arbeiten wurden diese Befunde von zahlreichen Autoren auch beim Tier bestätigt und die zentrale Bedeutung der Leberfunktion für den Eiweißstoffwechsel herausgestellt. (Chanutin u. Mitarb., Cheng, Fanucchi u. Mitarb., Horikawa, Jürgens, Whitman u. Mitarb., Whipple, Wuhrmann, Wunderly, Broichel u. Odenthal, Cohen u. Thompson, Schaffner u. Mitarb., Angulo-Ortega u. a.)

Gössner u. Mitarb. haben beim Amploidexperiment an der weißen Maus Serumeiweißveränderungen gleichen Typs mit deutlichen morphologischen Veränderungen an Leber und Milz gefunden (Leberzellhyperplasie, Mitosensteigerung, Zunahme der Zellplasma-Nucleotide, Vermehrung der Endothelzellen, lymphohistiocytäre Zellherde).

Über Serumproteinveränderungen mit Albuminabfall und extremer Vermehrung der γ-Fraktion bei der Lungentuberkulose des Menschen mit hepatolienalen Begleiterkrankungen berichten Körver u. Mitarb., Klee, Jahnke, Heilmeyer, Felder u. a.

Eine Aussage über das Verhalten der Antikörper im Zusammenhang mit der γ-Globulin-Vermehrung, wie sie von Brodhage u. a. bei der menschlichen Tuberkulose erwähnt wird, läßt unseres Erachtens der schnell fortschreitende Krankheitsprozeß mit schwersten Organveränderungen beim Meerschweinchen nicht zu. Bei der Heterogenität gerade dieser Fraktion (Wuhrmann) wird der Anteil der Immunkörper in jedem Fall von den unspezifischen Veränderungen überdeckt (Schaffner u. Mitarb.). Jedoch können auch hier nur immunchemische Paralleluntersuchungen zu einer Klärung beitragen.

Krankheitsverlauf und Pherogramm. Die Beobachtung von Krankheitsverlauf und Pherogramm nach Infektion mit virulenten, humanen Tuberkelbakterien zeigt somit bei den von uns untersuchten Meerschweinchen: Die Serumeiweißveränderungen von 19 Tieren geben den stetig fortschreitenden Krankheitsprozeß durch kontinuierliche Albuminabnahme und γ-Globulin-Zunahme wieder. 10 Tiere lassen im Pherogramm erkennen, daß die Erkrankung 3—5 Monate lang stationär gehalten wurde. Nur bei einem Tier zeigt das Bluteiweißbild die zumindest über ein Jahr anhaltende Bewältigung des Infektes an.

Es ist also möglich, auf Grund der Serumeiweißuntersuchungen die Entwicklung des spezifischen Krankheitsbildes zu verfolgen. Dabei kann

auch eine Aussage über die Prognose, zumindest für kürzere Zeit, gemacht werden. Wir weisen aber darauf hin, daß alle diese Urteile nur bei häufigen Einzeluntersuchungen abzugeben sind. Eine einmalige Bluteiweißuntersuchung stellt nur eine Momentaufnahme im Krankheitsgeschehen dar. Ihr Ergebnis kann zweifellos durch den methodischen Fehler und die individuellen Schwankungen einen falschen Schluß zulassen.

Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse

Die kritische, vergleichende Betrachtung des Bluteiweißbildes beim Meerschweinchen nach Infektion mit humanen, virulenzgeschwächten und virulenten Mycobakterien tbc. zeigte deutliche, statistisch signifikante Abweichungen der Albumine und γ-Globuline vom Pherogramm des gesunden Tieres. Das Verlaufsprotogramm beider Gruppen gibt typische Bilder wieder, die ein Ausdruck der Bluteiweißreaktion des Meerschweinchenorganismus im Sinne einer Dysproteinämie nach experimenteller Infektion mit humanen Tuberkelbakterien verschiedener Virulenzgrade sind. Sie zeichnen sich durch ganz unterschiedliche Reaktionskonstellationen aus. Bei den Tieren, die mit virulenzgeschwächten Erregern infiziert waren, bildet sich nach kurzem, akutem Initialstadium eine Dysproteinämie aus, die einer subchronischen, mit Gewebsproliferation einhergehenden Entzündung (Wuhrmann, Scheurlen, Letterer u. Schneider) entspricht und meist in einer, seltener in zwei Phasen (am häufigsten am 42. Tag), manifest wird. Der Krankheitsverlauf bei diesen Tieren und der pathologisch-anatomische Befund der zwei nach Herzpunktion verstorbenen Meerschweinchen bestätigen diese Reaktionskonstellation.

G. Meissner beschreibt in ihrer Arbeit: „Zur Frage der Virulenz chemoresistenter Tuberkelbakterien" Sektionsbefunde von Meerschweinchen, die nach Infektion mit virulenzgeschwächten Erregern zwischen der 8. und 12. Woche nach der Infektion getötet wurden oder intercurrent verstarben. Sie sah in den meisten Fällen: „nur eine isolierte Drüsentuberkulose mäßigen Ausmaßes und dazu nur teilweise noch einen geringfügigen Organbefall".

Ob die phasenförmige γ-Vermehrung auch eine Aussage über den Anstieg des Antikörpertiters (Brodhage) zuläßt, wäre bei dieser Verlaufsform möglich, kann aber unseres Erachtens aus den unspezifischen Serumeiweißveränderungen allein nicht abgeleitet werden.

Jahnke u. Scholtan glauben auf Grund eigener immunchemischer und elektrophoretischer Untersuchungen, daß der Tuberkulose-Antikörper nicht in der γ-Fraktion, sondern in einer Unterfraktion zwischen β- und γ-Globulin im Pherogramm wandert.

Dagegen steht zur Diskussion, ob nicht das zeitlich verschiedene Auftreten der γ-Gipfel die unterschiedliche Resistenzlage des Einzeltieres im Kollektiv anzeigt. Die Verlaufspherogramme beim Meerschweinchen nach Infektion mit humanen, virulenzgeschwächten Tuberkelbakterien wären

damit geeignet, die Frage der individuellen Organreaktion über längere Zeit hin zu verfolgen.

Demgegenüber gibt die Serumeiweißanalyse beim Meerschweinchen nach Infektion mit virulenten Erregern die schweren, generalisierten Organveränderungen, vor allem an Leber und Milz, als Reaktionskonstellation mit Albuminabfall und steilem γ-Globulin-Anstieg wieder. Auch hier sind die Reaktionsweisen des Einzeltieres im Ausmaß der Proteinveränderungen und dem zeitlichen Auftreten verschieden. Sie können auch auf eine individuelle, unterschiedliche Abwehrleistung des Organismus hindeuten. Dabei stellen nur wenige Tiere eine mehr protrahierte Verlaufsform bis zum Tode dar. In dieser Gruppe, nach virulenter Infektion, können die wesentlich veränderten Verlaufspherogramme keinesfalls zum Nachweis einer Immunkörpervermehrung herangezogen werden. Die unspezifischen, auf Grund der schweren Organbefunde an Leber und Milz manifest werdenden Konstellationsreaktionen müssen diesen spezifischen Anteil überdecken. Jedoch bedarf die Klärung dieser Frage ebenfalls parallel verlaufender, immunologischer Kontrollen.

Die Serumeiweißuntersuchungen in dieser Gruppe zeigen jedoch, daß das Verlaufspherogramm bei der experimentellen Tuberkulose des Meerschweinchens zur Prüfung der Zusammenhänge zwischen pathologisch-anatomischen Organveränderungen und Bluteiweißbild geeignet sind. Sie erscheinen weiterhin brauchbar für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs eventuell bei Anwendung therapeutischer Methoden, wie es Angulo-Ortega bereits mit INH-Versuchen nachweisen konnte.

Zusammenfassung

Serumeiweißuntersuchungen an gesunden Meerschweinchen mit Verlaufsserien über den Zeitraum von 20 Wochen ergeben konstante Mittelwerte und Streubereiche für Albumin und γ-Globuline bei geringen Abweichungen für α- und β-Globuline in den Untersuchungsserien.

Verlaufspherogramme von Meerschweinchen nach Infektion mit virulenzgeschwächten, humanen Tuberkelbakterien zeigen im Verlauf der Erkrankung eine vorübergehende, jedoch signifikante Vermehrung der γ-Globulin-Fraktion bei geringem Albuminabfall vorwiegend um den 42. Tag nach der Infektion. Es tritt dann eine Rückkehr der γ-Fraktion zum Normalwert und später ein erneuter, langsamer Anstieg zwischen dem 128. und 154. Tag post infectionem ein, der während der Zeit unserer Beobachtung bestehen bleibt. Diese Veränderungen werden als phasenförmige Reaktionskonstellationen einer subchronischen, proliferierenden Entzündung aufgefaßt.

Untersuchungsserien am Blutserum von Meerschweinchen nach Infektion mit virulenten, humanen Tuberkelbakterien zeigen Verlaufspherogramme mit kontinuierlichem Albuminabfall und steilem

γ-Globulin-Anstieg nach der Infektion, die wir als Ausdruck einer Dysproteinämie bei schwersten, vorwiegend cirrhotischen Organveränderungen an Leber und Milz deuten.

Die 439 pherographischen Einzeluntersuchungen mit 73 Verlaufsserien an Meerschweinchenseren ergeben, daß diese Methode, bei einem ausreichend großen Tierkollektiv, geeignet ist, zur Klärung des Krankheitsgeschehens nach experimenteller, tuberkulöser Infektion verschiedener Virulenzgrade beizutragen.

Literatur

Angulo-Ortega, A.: Beitr. Klin. Tbk. **111**, 229 (1954). — Antweiler, H. J.: Die quantitative Elektrophorese in der Medizin. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — Boguth, W.: Naturwissenschaften **40**, 22 (1953). — Zbl. Vet. Med. **1**, 311 (1954). — Brodhage, H.: Beitr. Klin. Tbk. **107**, 492 (1952). — Broichel, H., u. H. Odenthal: Klin. Wschr. **1954**, 592. — Chanutin, H. J., J. C. Hortenstine, W. S. Cole and St. Ludewig: J. of Biol. Chem. **123**, 246 (1938). — Cheng, K. K.: J. of Path. **61**, 23 (1949). — Cohen, S. S., and Thompson: J. Labor. a. Clin. Med. **32**, 314 (1947). — Deutsch, H. F., and M. B. Goodloe: J. of Biol. Chem. **161**, 1 (1945). — Edsall, J. T.: Adv. Protein Chem. **3**, 383 (1947). — Ewerbeck, H.: Z. exper. Med. **117**, 237 (1951). — Z. Kinderheilk. **73**, 421 (1953). — Fanucchi, F., C. Buss, F. Vitaly: Rass. Fisiopath. **21**, 315 (1949). — Felder, O.: Tuberkulosearzt **6**, 591 (1952). — Fuchs, W., u. A. Flachs: Klin. Wschr. **1955**, 903. — Gebelein, H., u. H. Heite: Statistische Urteilsbildung. Berlin 1951. — Gjessing, E. C., St. Ludewig, A. Chanutin: J. of Biol. Chem. **174**, 683 (1943). — Gössner, W., G. Scheider, M. Ziess, u. H. Stegmann: Virchows Arch. **320**, 326 (1951). — Grassmann, W., u. K. Hannig: Klin. Wschr. **1955**, 307. — Günther, O.: Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt/Main. Heft 51, 69. Stuttgart: Gustav Fischer. — Heilmeyer, L.: Klin. Wschr. **1950**, 254. — Horikawa, M.: Tohoku J. Exper. Med. **28**, 90 (1936). — Jahnke, K., u. W. Scholtan: Beitr. Klin. Tbk. **105**, 249 (1949); **108**, 169 (1953). — Jürgens, R., u. F. Gebhardt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **175**, 558 (1934). — Klee, Ph., H. Hörlein u. K. Jahnke: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 525. — Körver,, H. A. Massenberg u. L. Schümer: Tuberkulosearzt **5**, 581 (1951). — Kracht, J., u. G. Meissner: Verh. dtsch. Ges. Path. **39**, 134 (1956) (noch nicht erschienen.) — Letterer, E., u. G. Schneider: Plasma **1**, 263 (1953). — Luetscher: J. Clin. Invest. **19**, 313 (1940). — Meissner, G.: Beitr. Klin. Tbk. **110**, 219 (1953). — Pieper, J., u. H. Molinski: Klin. Wschr. **1954**, 985. — Riva, G., u. V. Martini: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 73. — Schaffner, F., G. C. Turner, D. E. Eshbank, W. B. Bukkingham u. H. Popper: Ref. Dtsch. med. Wschr. **1954**, 765. — Schneider, G.: Virchows Arch. **317**, 26 (1949). — Scheurlen, P. G.: Plasma **2**, 209 (1954). — Sharp, J. G. u. Mitarb.: J. of Immun. **44**, 115 (1942). — Weymer, H. E., J. Redlich-Moshin, R. A. Boak, E. Bogen and Ch. M. Carpenter: Amer. Rev. Tbc. **70**, 344 (1954). — Whipple, G. H.: Amer. J. Med. Sci. N. s. **196**, 609 (1938). — Whitman, J. F., A. R. Rossmiller and L. A. Lewis: J. Labor. a. Clin. Med. **35**, 167 (1950). — Wuhrmann, F., u. Ch. Wunderly: Die Bluteiweißkörper der Menschen. Basel: Benno Schwabe 1952. — Wuhrmann, F., Ch. Wunderly u. de Nicola: Klin. Wschr. **1950**, 667. — Wunderly, Ch.: Die Papierelektrophorese. Aarau-Frankfurt: Sauerländer & Co. 1954.

Dr. Hans-Hugo Rabe, Tuberkulose-Forschungs-Institut,
Borstel über Bad Oldesloe, Institut f. exper. Biologie u. Medizin

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 331—337 (1956)

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. F. Jung)

Methämoglobinrückbildung in Reticulocyten*

Von

HANSJÜRGEN MATTHIES

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. April 1956)

In der normalen Erythrocytenpopulation des Säugetierblutes mit seinen kernlosen roten Zellen zeichnet sich ein geringer Prozentsatz durch eine morphologische Besonderheit aus. In diesen Zellen kann durch Vitalfärbung mit Brillantkresylblau oder Nilblausulfat eine körnchen- oder seltener netzartige Struktur sichtbar gemacht werden, die sogenannte Substantia reticulofilamentosa; diese Zellen werden Reticulocyten (Rc.) genannt. Auf Grund des gehäuften Auftretens der Rc. bei Vorgängen mit gesteigerter Blutneubildung war man zu dem Schluß gekommen, daß es sich bei den Rc. um jugendliche, noch nicht völlig ausgereifte Formen der roten Blutzellen handelt.

Es bestehen aber auch Ansichten, daß das bei der Vitalfärbung entstehende Bild ein Artefact auf der Grundlage submikroskopisch vorgebildeter morphologischer Anordnungen in der Zelle sei, auf denen sich normalerweise diffus in der Zelle verteilte Stoffe unter dem Einfluß der Präparation niederschlagen (KOSENOW). Auch werden reticuläre Strukturen und Polychromasie als verschiedene Formen einer Entwicklungsstufe der Erythrocyten angesehen. Die phasenoptische (KONITZER) und elektronenoptische Darstellung der fraglichen Strukturen (JUNG 1, 2) lassen aber doch das Vorhandensein solcher morphologischen Elemente auch in vivo in neuem Licht erscheinen. Die kürzlich erschienene Arbeit von WOLPERS hat durch die Anwendung der Feinschnittechnik für die Elektronenmikroskopie an Stelle der bislang üblichen Hämolysepräparate in überzeugender Weise das Vorhandensein einer granulären Substanz in den Rc. belegt. Die größere elektronenoptische Dichte deutet auf eine Anhäufung von schweren Atomen hin, was ja auch durch chemische Analysen schon gezeigt wurde. Offensichtlich handelt es sich um Ribonucleinsäuren (RNS), die charakteristische Lichtabsorption bei 2600 Å und der negative Ausfall des Feulgen-Tests deuten darauf hin (HAENEL). Neuerdings konnten die RNS fast quantitativ durch Brillantkresylblau ausgefällt werden (COUTELLE, RAPOPORT u. LINDIGKEIT), nachdem gezeigt worden war, daß mindestens 90% der RNS jugendlicher Blutzellen im Hämolysat nachzuweisen sind (LINDIGKEIT u. RAPOPORT).

Eine Proportionalität zwischen Rc.-Anstieg und Zunahme der RNS im Blut konnte von HOLLOWAY u. RIPLEY nachgewiesen werden. Auch dabei zeigte es sich, daß die Desoxyribonucleotide ohne Bedeutung für die Rc. sind.

Diesen und anderen morphologischen und chemischen Besonderheiten der Rc. entsprechen nun auch funktionelle Eigenarten, wie aus der Einheit von Struktur

* Vgl. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 442 (1955).

und Stoffwechsel nicht anders zu erwarten ist. Für die nähere Untersuchung dieser beiden Eigenschaften der belebten Materie in ihren gegenseitigen Beziehungen erscheinen die Rc. besonders geeignet, da sie sich verhältnismäßig leicht erzeugen lassen und gut von den reifen Zellen zu differenzieren sind. Außerdem erlauben sie das Studium der dynamischen Veränderungen dieser Beziehungen während des Reifungsprozesses auch in vitro. In diesem Zusammenhang sind besonders die neueren Arbeiten von RAPOPORT u. Mitarb. zu nennen.

Der auffälligste und auch zuerst entdeckte funktionelle Unterschied zwischen reifen und jugendlichen roten Blutzellen besteht in der Art des Grundstoffwechsels: Während die reifen Erythrocyten fast ausschließlich glykolysieren, zeigen die Rc. eine beträchtliche Atmung, vor allem, wenn man das an den Stoffwechselvorgängen nicht unmittelbar beteiligte Chromoproteid, das Hämoglobin, vom Gesamtprotein der Rc. in Abzug bringt (MICHAELIS u. SALOMON, WRIGHT, RAMSAY u. WARREN, JACOBSEN u. PLUM). Dieser Befund ist aber nur *ein* Ausdruck der Veränderungen, welche die roten Blutzellen im Verlauf ihrer Entwicklung durchmachen, zudem ein Ausdruck sehr komplexer Natur. Es erscheint daher notwendig zu sein, die im Erythrocyten vorhandenen Fermentsysteme während des Reifungsvorganges zu differenzieren. Wir haben im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über die Methämoglobinrückbildung in Erythrocyten unsere besondere Aufmerksamkeit den daran beteiligten Fermentsystemen zugewandt. Über einige vorläufige Ergebnisse wurde bereits an anderer Stelle kurz berichtet (MATTHIES 1).

Methodik

Die Untersuchungen wurden an Kaninchenerythrocyten durchgeführt. Durch alternierende Herzpunktionen wurden den Tieren jeweils 40 ml Blut entnommen, nach der dritten bis vierten Entnahme konnten 25—30% Rc. erreicht werden. Ihre Zählung erfolgte an Ausstrichen mit Nilblausulfat vital gefärbter Zellen, wobei jeweils 2000 ausgezählt wurden. Nach Mischen des entnommenen Blutes mit dem gleichen Volumen 2,4%iger $NaNO_2$-Lösung wurden die Zellen nach 10 min mit phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung (p_H 7,4) dreimal gewaschen und mit der gleichen Salzlösung eine 30%ige Zellsuspension hergestellt. Der Anfangs-Methämoglobingehalt betrug dann 90 –95%. Die Messung der Methämoglobin-Rückbildung erfolgte manometrisch in CO-Atmosphäre, die Bindung des CO durch das entstehende Hämoglobin (Hb[2]) wurde als Maß der Rückbildung genommen. Als Substrate gelangten Glucose 0,01 m, Glucose 0,01 m und Methylenblau 0,0001 m als Katalysator, Lactat 0,01 m sowie Formaldehyd 0,005 m zur Anwendung. Die maximalen Rückbildungsgeschwindigkeiten wurden auf die Standardbedingungen umgerechnet (μl CO/h · 10^9 Zellen).

Ergebnisse

Ließen wir die Rückbildung des Hb (3) ohne Substratzusatz, das heißt mit den in den Zellen vorhandenen nichtauswaschbaren Substratdepots ablaufen, so konnte mit steigender Reticulocytenzahl ein Anstieg der Rückbildungsgeschwindigkeit beobachtet werden (Abb. 1). Eine Verdoppelung liegt bei etwa 20% Rc. vor, Extrapolation auf 100% ergäbe

eine sechs- bis siebenfache Aktivität der Rc. gegenüber der Rc.-freien Suspension.

Bei Zugabe von Glucose wird die Aktivitätssteigerung noch deutlicher: Extrapolation ergibt eine mehr als achtfache Hb(3)-Rückbildungsgeschwindigkeit der Rc. In noch viel größerem Maße ist dieser Vorgang beschleunigt, wenn zur Glucose Methylenblau als Katalysator gegeben wird (Abb. 1). Eine reine Rc.-Suspension müßte danach eine zwanzigfache Rückbildungsaktivität gegenüber normalem Blut zeigen. Die vorgenommenen Extrapolationen ergeben selbstverständlich keine vollständig sicheren Zahlen, da sie aus Durchschnittswerten gemischter Zellpopulationen gewonnen wurden. Wenn man aber bedenkt, daß die Ausschwemmung der Rc. sehr schnell im Verhältnis zur Lebensdauer der Erythrocyten erfolgt, so kann man sie doch zumindest größenordnungsmäßig der Rückbildungsaktivität der Rc. gleichsetzen.

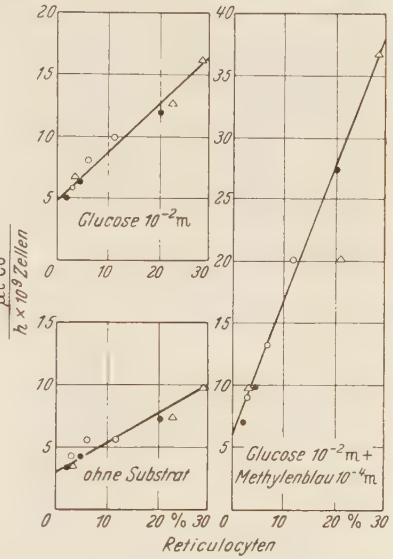


Abb. 1. Hb(3)-Rückbildungsgeschwindigkeit in reticulocytenhaltigen Zellsuspensionen ohne Substratzusatz, mit 0,01 m Glucose und mit 0,01 m Glucose plus 0,0001 m Methylenblau als Substrat. Die Werte einer Versuchsreihe sind an den gleichen Zeichen erkenntlich

Ganz andere Ergebnisse erhielten wir bei Anwendung von Lactat als Substrat. Ohne Zweifel kann von einer erhöhten Aktivität der Rc. in diesem Fall nicht gesprochen werden, eher ist eine gewisse Erniedrigung angedeutet (Abb. 2). Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Wirkung von Formaldehyd auf die Struktur und den Stoffwechsel der Erythrocyten, über die später berichtet werden soll, gaben wir an Stelle der üblichen Substrate Formaldehyd in einer Konzentration von 0,005 m. Es zeigte sich das gleiche Bild wie bei Lactat: Die Rc. zeigten keine stärkere

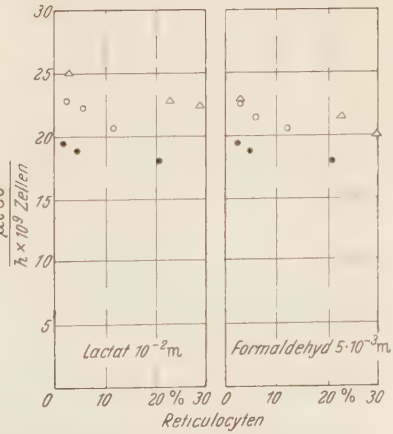
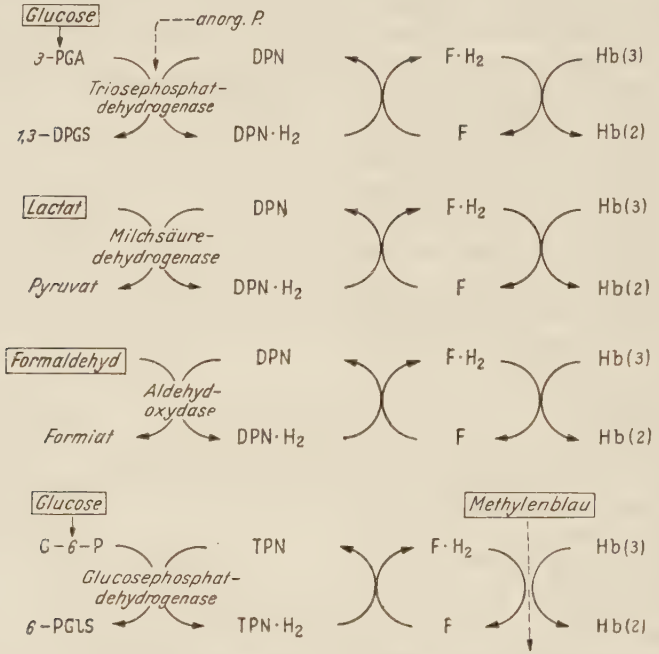


Abb. 2. Wie Abb. 1, aber mit 0,01 m Lactat und 0,005 m Formaldehyd als Substrat

Rückbildungsgeschwindigkeit mit diesem Substrat. Die absoluten Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie bei der durch Lactat bewirkten Rückbildungsbeschleunigung. Auch hier ist eine geringe Erniedrigung der Aktivität bei hohen Rc.-Zahlen angedeutet.

Diskussion

Zur Deutung der Ergebnisse ist es notwendig, sich einen Überblick über die an der Hb(3)-Rückbildung beteiligten Fermentsysteme zu verschaffen. Dazu mögen die folgenden Schemata dienen, die auf der Grundlage der angeführten Literatur zusammengestellt wurden:



Erklärung: *3-PGA* 3-Phosphoglycerinaldehyd; *1,3-DPGS* 1,3-Diphosphoglycerinsäure; *G-6-P* Glucose-6-Phosphat; *6-PGlS* 6-Phosphogluconsäure; *DPN* Diphosphopyridinnucleotid, oxydierte Form; *DPN · H_2* Diphosphopyridinnucleotid, reduzierte Form; *F* Flavinnucleotid oder -enzym, oxydierte Form; *F · H_2* Flavinnucleotid oder -enzym, reduzierte Form; *TPN* Triphosphopyridinnucleotid

Über die Besonderheiten der einzelnen Reaktionswege und ihre Herleitung wurde ausführlicher unter anderem von KIESE und GRANICK berichtet. Es sei noch dazu bemerkt, daß das sogenannte nicht auswaschbare Substrat wahrscheinlich auf die gleiche Weise wie Glucose die Rückbildung des Hb(3) bewirkt. Es handelt sich dabei wohl um die in den Zellen vorhandenen Phosphorsäureester der Hexosen.

Was den Elektronentransport zwischen TPN und Hb(3) betrifft, haben KIESE und ALTMANN die Zwischenschaltung eines Flavinsystems

bereits nachgewiesen, für die Reduktion des Hb(3) durch die DPN-abhängigen Reaktionen wird die Notwendigkeit einer solchen Zwischenstufe durch die Untersuchungen von Gibson und Matthies 2 an Fällen von idiopathischer Methämoglobinämie ebenfalls belegt. Wenn man die verschiedenen Möglichkeiten der Hb(3)-Rückbildung der Deutung der hier vorgelegten Ergebnisse zugrunde legt, wird man zunächst nach gemeinsamen Faktoren sowohl für die in den Rc. verstärkt ablaufenden Reaktionen, als auch für diejenigen mit unveränderter Aktivität suchen. Dabei ist an die Fermentproteine, die Pyridinnucleotide und an die schon erwähnten Flavinsysteme zu denken. Auf den ersten Blick erscheint es schwierig, eine befriedigende Erklärung zu finden, wenn man nicht von vornherein einen verschiedenen Abbau der Apofermente während der Reifung annimmt. Betrachtet man dagegen die Befunde im Hinblick auf die beteiligten Codehydrasen, so stehen die DPN-abhängigen Reaktionen mit Lactat und Formaldehyd ohne Aktivitätsänderung während der Reifung dem TPN-abhängigen und durch Methylenblau katalysierten G-6-P-System mit starker Aktivitätsabnahme gegenüber.

Unklar bleiben lediglich die Befunde mit Glucose als Substrat, bei denen doch in einer DPN-abhängigen Reaktion auf der Stufe der Triosephosphate keine Aktivitätssteigerung zu erwarten wäre, und die wahrscheinlich auf die gleiche Weise verlaufende Oxydation des endogenen Substrats. Es ist allerdings daran zu denken, daß ein Teil der Glucose auch ohne Methylenblaukatalyse über das TPN-System oxydiert wird, sicher aber dann, wenn dieses System eine so hohe Aktivität wie in den Reticulocyten zeigt. Diese Deutung wird auch noch verständlicher, wenn man bedenkt, daß das TPN vorwiegend für Apodehydrasen der intakten Atmung benötigt wird, nicht aber für das normale glykolytische System der reifen Erythrocyten. Was allerdings diesen Überlegungen widerspräche, wären Befunde aus dem Arbeitskreis von Rapoport, aus denen hervorgeht, daß das TPN im Verlauf der Reifung keine wesentliche Veränderung erfährt.

Im allgemeinen sind die Pyridinnucleotide auch nicht die limitierenden Faktoren der Stoffwechselprozesse, vielmehr hat Altmann gerade zeigen können, daß die schon erwähnten, zwischen TPN · H_2 und Hb(3) eingeschalteten Methämoglobinreduktasen die Hb(3)-Rückbildung begrenzen. Damit wird die Aufmerksamkeit auf den dritten Faktor der Hb(3)-Rückbildung gelenkt, auf die Flavinsysteme. Daß sie sehr entscheidend die Geschwindigkeit dieses Prozesses beeinflussen, geht auch daraus hervor, daß ihre Konzentration nur ein hundertstel der Pyridinnucleotidkonzentration in den reifen Zellen beträgt.

Sowohl die Kiesesche Hämiglobinreduktase aus Pferdeerythrocyten, als auch die Methämoglobinreduktase von Altmann aus einer Cytochrom-c-Reduktase-Präparation aus Bierhefe sind lediglich am TPN-System untersucht worden. Gibson hat die verminderte Hb(3)-Rückbildung in den Hämolysaten von Patienten mit idiopathischer Methämoglobinämie durch Zusatz von Straubschem Flavoprotein steigern können, wobei sich ebenfalls ergab, daß das Flavinsystem den limitierenden Faktor der Hb(3)-Reduktion darstellt. Allerdings hat Gibson ein DPN-abhängiges System in diesem Zusammenhang untersucht. Die Beschleunigung durch

einen reversiblen Farbstoff ist in diesem Fall nicht sehr groß, in Übereinstimmung mit unseren Versuchen, und wahrscheinlich gar nicht durch eine Aktivierung des DPN-Systems bedingt, wie GIBSON auf Grund seiner Versuche annehmen möchte, sondern durch Einwirkung des Methylenblaus auf die Oxydation des endogenen Substrats über das TPN-System. Das geht auch aus den Werten von GIBSON selbst hervor:

	ohne Substrat		Glucose		Lactat	
	ohne Methylenblau	mit Methylenblau	ohne Methylenblau	mit Methylenblau	ohne Methylenblau	mit Methylenblau
Normale Zellen	1,2	1,2	3,7	11,7	3,5	4,4
Patholog. Zellen	0,8	0,5	1,2	13,7	1,1	0,8

(Zahlen sind Mittelwerte der Ergebnisse von GIBSON und geben μmol reduziertes Hb(3) je Stunde an.)

Die Beschleunigung durch Methylenblau ist lediglich in den Ansätzen mit Glucose bedeutend, und zwar auch in den pathologischen Zellen. In den anderen Ansätzen, die nach unserer Vorstellung über die DPN-abhängigen Systeme laufen, vermag Methylenblau keine Effekte zu erzielen. Es wird aus den oben angeführten Werten auch ohne weiteres ersichtlich, daß die pathologischen Veränderungen nur die DPN-abhängigen Systeme betreffen. Danach muß der Cofaktor für die beiden Rückbildungsmöglichkeiten verschieden sein.

Aus allen diesen Überlegungen möchten wir die Annahme herleiten, daß in jugendlichen Blutzellen, wie sie nach akuten Blutverlusten im Kreislauf auftreten, die stärkere Hb(3)-Rückbildung sowohl durch endogenes Substrat, als auch durch Glucose allein und vor allem durch Glucose mit Methylenblau als Katalysator zurückzuführen ist auf höhere Konzentrationen eines Flavinsystems vom Typ der KIESEschen oder ALTMANNschen Methämoglobinreduktase. Dieses System muß dann im Verlauf der Reifung der roten Blutzelle einem Abbau unterliegen.

Für die DPN-abhängigen Reaktionswege der Hb(3)-Rückbildung ergibt sich die Notwendigkeit eines anderen Co-Faktors. Dieser ist möglicherweise auch ein, wenn auch anders aufgebautes Flavinsystem, daß nicht derartigen Abbauvorgängen unterliegt. Inwieweit sich diese beiden Elektronenüberträger voneinander unterscheiden, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Zusammenfassung

1. Die Aktivität der Methämoglobinrückbildung in reifen Erythrocyten des Kaninchens wird verglichen mit derjenigen in jugendlichen roten Blutzellen, die sich durch die morphologische Besonderheit einer reticulofilamentären Struktur auszeichnen.

2. Durch Extrapolation ergibt sich für die Rückbildung je nach dem Substrat eine sechs- bis zwanzigfache Aktivität der Reticulocyten im Vergleich zu den reifen Zellen.

3. Die Rückbildung durch Lactat und durch Formaldehyd ist bei den Reticulocyten ebenso groß wie bei den reifen Zellen.

4. Die Ursachen dieser verschiedenen Aktivitätsveränderung der Rückbildungssysteme während des Reifungsprozesses werden diskutiert, wobei den Methämoglobinreduktasen besondere Bedeutung beigemessen wird.

Literatur

Altmann, K. I.: Biochim. et Biophysica Acta **15**, 155 (1954). — Coutelle, R., S. Rapoport u. R. Lindigkeit: Naturwissenschaften **42**, 127 (1955). — Gibson, Q. H.: Biochemic. J. **42**, 13 (1948). — Granick, S.: Blood **4**, 404 (1949). — Haenel, U.: Acta haematol. (Basel) **2**, 298 (1949). — Holloway, B. W., and S. H. Ripley: J. of Biol. Chem. **196**, 695 (1952). — Jacobsen, E., u. C. M. Plum: Acta physiol. scand. (Stockh.) **7**, 168 (1944). — Jung, F.: Dtsch. Gesundheitswesen **8**, 1558 (1953); Symposion über Struktur und Funktion der roten Blutkörperchen an der Humboldt-Universität Berlin, 1955. — Kiese, M.: Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — Konitzer, K.: Untersuchungen über die Struktur der Substantia granulofilamentosa jugendlicher Erythrocyten. Inaug.-Dissertation, Berlin, Humboldt-Univ. 1951. — Kosenow, W.: Acta haematol. (Basel) **7**, 360 (1952). — Lindigkeit, R., u. S. Rapoport: Naturwissenschaften **42**, 127 (1955). — Matthies, H., K. Onnen u. F. Jung: Dtsch. Gesundheitswesen **8**, 1562 (1953). — Matthies, H.: unveröffentlicht. — Michaelis, L., and K. Salomon: J. Gen. Physiol. **13**, 683 (1930). — Ramsay, R., and C. O. Warren: Quart. J. Exper. Physiol. **22**, 49 (1932). — Rapoport, S.: persönl. Mitteilung. — Wolpers, C.: Klin. Wschr. **1956**, 61. — Wright, G. P.: J. Gen. Physiol. **14**, 179 (1931).

Dr. Hansjürgen Matthies, Berlin, Institut f. Pharmakologie u. Toxikologie der Humboldt-Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 338—347 (1956)

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel

Wirkungsverstärkung von Renin und Nierenextrakt an der nierenlosen Ratte

Von
F. Gross und F. Sulser

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Juni 1956)

Die gesteigerte Empfindlichkeit des nierenlosen Tieres gegenüber Renin ist schon von Tigerstedt u. Bergmann beschrieben worden[13] und die biologische Testierung aus der Niere isolierter, drucksteigernd wirkender Substanzen erfolgt daher häufig an nephrektomierten Tieren[10, 14]. Auch an der Ratte führen Nierenextrakte oder Renin nach Entfernung beider Nieren zu einem verstärkten und verlängerten Blutdruckanstieg[5, 11], jedoch fehlen bisher systematische Vergleichsuntersuchungen über den Einfluß der Nierenexstirpation auf die pressorische Wirkung von Nierenextrakten, Renin und Hypertensin (Angiotonin), sowie anderer blutdrucksteigernder Substanzen. Die vorliegende Mitteilung berichtet über die Beeinflussung des arteriellen Blutdruckes durch Adrenalin, Nor-Adrenalin, Pitressin, Nierenextrakt, Renin und Hypertensin an normalen und nierenlosen Ratten. Ziel dieser Untersuchung war es

1. die Bedingungen für die Verstärkung der Blutdrucksteigerung von Renin und Nierenextrakt nach Nierenentfernung genauer abzuklären und
2. den der Wirkungsverstärkung zugrunde liegenden Mechanismus zu analysieren.

Methodik

Für die Versuche wurden männliche Albino-Ratten von durchschnittlich 250 bis 300 g Gewicht verwendet. Am Tage vor dem Blutdruckversuch wurden in Äthernarkose ausgehend von einem entlang der Wirbelsäule geführten Schnitt in der Rückenhaut beide Nieren entfernt. 18—20 Std nach diesem Eingriff wurden die Tiere mit Urethan (1,4 g/kg s.c.) narkotisiert, anschließend ein Quecksilbermanometer besonders kleiner Dimension an die Art. carotis communis angeschlossen und der Blutdruck auf dem Rußkymographion registriert.

Herstellung des Nierenextraktes: Rattennieren werden sofort nach Exstirpation grob mit Schere oder Skalpell zerkleinert, dann mit Quarzsand fein verrieben, in 0,9%iger Kochsalzlösung (1 ml/g) aufgeschwemmt und anschließend zentrifugiert (3000 Touren während 10 min). Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert und nochmals scharf (12000 Touren während 10 min) zentrifugiert. Von den auf diese Weise hergestellten Extrakten wurde als Standarddosis 0,1 ml in die vena jugularis injiziert.

Als Renin wurde ein aus Schweinenieren hergestelltes Rohpräparat* verwendet, von dem 0,25 mg kg bei intravenöser Injektion an der mit Dial narkotisierten Katze zu einer durchschnittlichen Drucksteigerung von 30 mm Hg führen. In den Versuchen an Ratten wurde als Standarddosis 1 mg kg i.v. injiziert. Diese Dosis führt am intakten Tier zu einer durchschnittlichen Drucksteigerung von 40 mm Hg.

Hypertensin stand in Form eines weitgehend gereinigten Präparates** zur Verfügung, das 1200—1500 Hunde E/mg Substanz enthielt. Die Standarddosis betrug 0,005 mg/kg intravenös.

Von Pitressin (Parke-Davis) wurden 0,1 E/kg, von Adrenalin und Nor-Adrenalin 0,002 mg/kg intravenös gegeben. Alle Injektionen erfolgten in die vena jugularis.

Resultate

Entfernung beider Nieren führt innerhalb von 20 Std zu keiner signifikanten Änderung des Blutdruckes am narkotisierten Tier. Der in Urethannarkose in der A. carotis gemessene Blutdruck ist am intakten

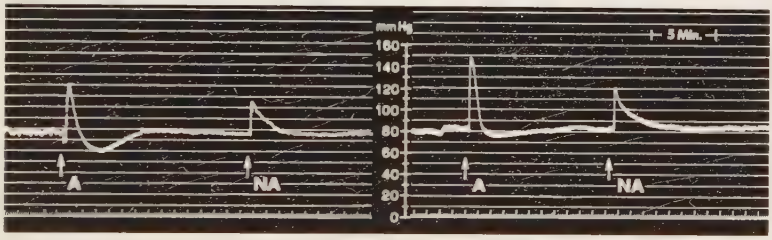


Abb. 1. Wirkung einer intravenösen Injektion von Adrenalin (A) und von Nor-Adrenalin (NA) (je 0,002 mg/kg) an der intakten (links) und nephrektomierten Ratte (rechts)

und am nierenlosen Tier ungefähr gleich und beträgt bei der verwendeten Versuchsanordnung durchschnittlich 80 mm Hg.

An der nierenlosen Ratte sind sowohl die Intensität als auch die Dauer des Druckanstieges nach i.v. Injektion von Adrenalin oder Nor-Adrenalin geringgradig verstärkt bzw. verlängert, und zwar für Nor-Adrenalin etwas deutlicher als für Adrenalin. Die am intakten Tier nach Adrenalin meist zu beobachtende sekundäre Drucksenkung kann nach Nephrektomie fehlen oder deutlich abgeschächt sein (Abb. 1).

Die durch Pitressin ausgelöste Blutdrucksteigerung wird durch Nierenentfernung erheblich verstärkt und verlängert. Der Druck steigt auf höhere Werte an und sinkt langsamer ab als bei Anwesenheit der Nieren (Abb. 2). Dementsprechend nimmt der Planimeterwert für das Integral der Blutdruckkurve auf etwa das Dreifache zu (Tab. 1).

Während durch Nierenentfernung der blutdrucksteigernde Effekt der adrenergischen Wirkstoffe nur quantitativ verändert wird, zeigt die

* Wir danken Herrn Dr. B. Kleinberg, Princeton, für die Herstellung des Präparates.

** Wir danken Herrn Dr. Schwarz, Cleveland Clinic, Research Division, Cleveland/Ohio, für die Überlassung des Präparates.

Blutdruckkurve nach Injektion von Pitressin auch einen qualitativ anderen Verlauf.

Wesentlich deutlicher tritt der qualitative Unterschied zwischen der Reaktion des intakten und des nierenlosen Tieres bei Injektionen von Renin oder Nierenextrakt in Erscheinung. Am intakten Tier führt das

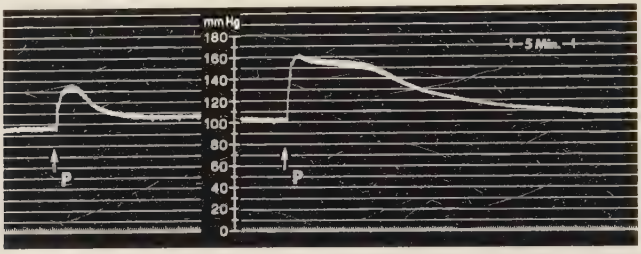


Abb. 2. Wirkung einer intravenösen Injektion von 0,1 E/kg Pitressin (P) an der intakten (links) und nephrektomierten Ratte (rechts)

verwendete Reninpräparat in der Dosis von 1 mg/kg im Durchschnitt zu einem einige Minuten anhaltenden Druckanstieg von 43 mm Hg, und frisch hergestellter Extrakt aus Rattennieren hat nur eine angedeutete

Tabelle 1. *Maximale Blutdrucksteigerung, Dauer und Integral des Druckanstieges nach intravenöser Injektion verschiedener blutdrucksteigernder Substanzen bei normalen und nierenlosen Ratten. Mittelwerte aus je 10 Versuchen. Mittlere quadratische Abweichung (σ)*

Intravenöse Injektion von:		Ausgangsdruck des Testtieres in mm Hg	Maximale Blutdrucksteigerung in mm Hg	Dauer des Druckanstieges in Minuten	Integral der Blutdruckkurve (Planimeterwert) in Kubikzentimeter
Adrenalin 0,002 mg/kg	intakt. Tier	78 ± 6	38 ± 13	$1{,}3 \pm 0{,}9$	$1{,}3 \pm 0{,}9$
	nierenlos	82 ± 2	47 ± 8	$2{,}1 \pm 1$	$1{,}9 \pm 0{,}4$
Nor-Adrenalin 0,002 mg/kg	intakt. Tier	78 ± 6	25 ± 6	$2{,}7 \pm 1{,}6$	$2{,}0 \pm 1{,}3$
	nierenlos	82 ± 2	44 ± 11	$4{,}1 \pm 1{,}2$	$3{,}0 \pm 1{,}0$
Pitressin 0,1 E/kg . .	intakt. Tier	84 ± 7	47 ± 6	16 ± 5	8 ± 3
	nierenlos	78 ± 5	77 ± 10	27 ± 8	23 ± 6
Hypertensin 0,005 mg/kg	intakt. Tier	84 ± 6	25 ± 7	2 ± 1	2 ± 1
	nierenlos	85 ± 4	50 ± 10	5 ± 2	$3 \pm 0{,}8$
Renin 1 mg/kg	intakt. Tier	75 ± 4	43 ± 8	11 ± 3	6 ± 3
	nierenlos	74 ± 8	90 ± 12	> 30	> 58
Normalnierenextrakt 0,1 ml	intakt. Tier	85 ± 5	10 ± 3	5 ± 2 (1 Versuch > 30)	2 ± 3
	nierenlos	78 ± 8	62 ± 10	> 30	> 42

Zunahme oder gar keine Änderung des Druckes zur Folge. Am nierenlosen Tier ist dagegen nicht nur die Blutdruckzunahme verstärkt und zwar besonders nach Injektion von Nierenextrakt, sondern vor allem auch erheblich verlängert. Der Druck steigt steil auf einen maximalen Wert an und fällt dann meist langsam wieder um 20—30 mm Hg auf ein Niveau ab, das etwa 30—40 mm über dem Ausgangswert liegt

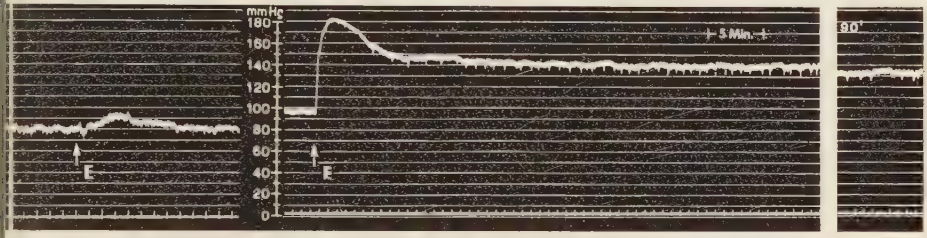


Abb. 3. Wirkung einer intravenösen Injektion von 0,1 ml wäßrigem Extrakt (E) aus Rattennieren an der intakten (links) und nephrektomierten Ratte (rechts). Das Endstück der Kurve ist nach einer Unterbrechung von 90 min registriert

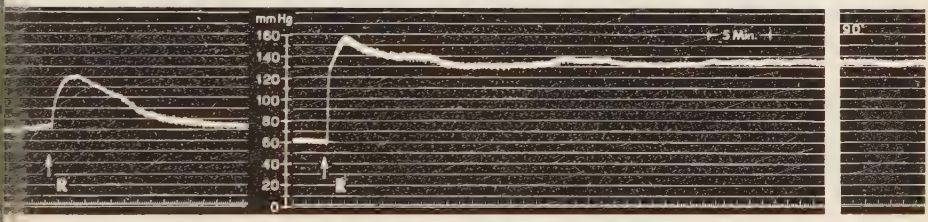


Abb. 4. Wirkung einer intravenösen Injektion von 1 mg/kg Renin (R) an der intakten (links) und nephrektomierten Ratte (rechts). Das Endstück der Kurve ist nach einer Unterbrechung von 90 min registriert

(Abb. 3, 4). Dieser erhöhte Wert wird während mehrerer Stunden eingehalten, und in keinem unserer Versuche war innerhalb 3—4 Std ein Rückgang des Blutdruckes auf den Ausgangswert zu beobachten.

Eine Verstärkung und Verlängerung der durch pressorische Substanzen aus der Niere auslösbaren Blutdrucksteigerung ist schon unmittelbar nach Nierenexstirpation zu beobachten, jedoch sind Intensität und Dauer der Wirkung noch nicht maximal verstärkt. Eine maximale Renin-Reaktion tritt etwa 4 Std nach Nierenexstirpation auf und auch durch ein längeres Intervall zwischen Entfernung der Nieren und Injektion von Renin bzw. Nierenextrakt läßt sich keine weitere Zunahme oder Verlängerung der Blutdrucksteigerung erreichen.

Die von uns verwendete Standarddosis von 1 mg/kg Renin führt jeweils zu einer maximalen Blutdrucksteigerung, die sich durch Erhöhung der Dosis nicht mehr verstärken läßt. Mit niedrigeren Renin-Dosen ist ebenfalls eine typische Änderung der Blutdruckreaktion am nierenlosen Tier zu beobachten und zwar besonders im Hinblick auf die Verlängerung

der Wirkungsdauer. Bereits Dosen von 0,001—0,01 mg/kg führen zu einer langanhaltenden plateauförmigen Druckzunahme am nierenlosen Tier. Die Reaktion ist aber nicht nur verlängert, sondern auch verstärkt, da gleiche Dosen am intakten Tier entweder keine oder wesentlich geringere Blutdrucksteigerung hervorrufen.

Die Dosiswirkungskurve verläuft über einen weiten Bereich linear (Abb. 5). Werden Dosen über 0,1 mg/kg injiziert, so kommt es nach dem maximalen Anstieg zu einem leichten Abfall des Druckes, der sich dann

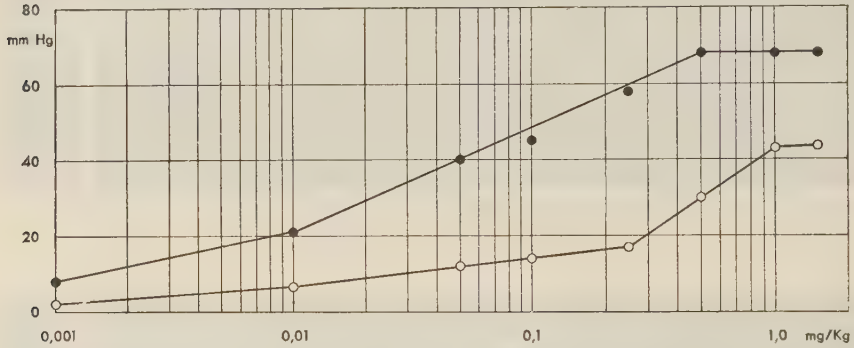


Abb. 5. Dosiswirkungskurve von Renin bezogen auf maximale Blutdrucksteigerung an der nierenlosen (•——•) und an der intakten Ratte (○——○). Ordinate: Blutdrucksteigerung in mmHg; Abszisse: Dosen von Renin in mg/kg (logarithmischer Maßstab)

auf ein stabiles Niveau einstellt. Dieser Kurvenverlauf entspricht demjenigen der Abb. 4 (rechts). In dem Dosenbereich zwischen 0,1 und 1,0 mg/kg führt Steigerung der Dosis somit nur zu einem etwas größeren initialen Druckanstieg, aber nicht zu einer zusätzlichen Verlängerung der Wirkungsdauer.

Am intakten Tier zeigt Renin eine ausgesprochene tachyphylaktische Wirkung. Wiederholte Injektion der gleichen Dosis in verhältnismäßig kurzen Zeitabständen (15—30 min) führt zur Verminderung der Blutdruckreaktion. Um nach einer zweiten Renin-Dosis die gleiche Druckzunahme wie nach der ersten Injektion zu erhalten, war bei unserer Versuchsanordnung eine Zeitspanne von mindestens 1 Std erforderlich. Die Rückkehr des Blutdruckes auf den Ausgangswert, die nach der bei uns üblichen Standarddosis von 1 mg des verwendeten Renin-Präparates innerhalb 10—12 min erfolgte, ist somit noch nicht gleichbedeutend mit der Wiederherstellung der vollen Reaktionsfähigkeit des Blutdruckes auf Renin. Am nierenlosen Tier, bei dem der Druck nach der ersten Renin-Injektion nicht mehr auf den Ausgangswert zurückkehrt, führen wiederholte Gaben von Renin zu geringgradiger zusätzlicher Drucksteigerung, wobei ein Wert, der dem nach der ersten Injektion erreichten Maximum entspricht, nicht überschritten wird. Der zusätzliche Druckanstieg nach wiederholter Injektion ist im allgemeinen nur kurzdauernd.

Es ist anzunehmen, daß in frisch hergestelltem Extrakt aus Rattennieren im wesentlichen Renin für die pressorische Wirkung verantwortlich ist. Das heterologe (aus Schweinenieren) und homologe Renin wirken qualitativ ähnlich auf den Blutdruck und die gekreuzte tachyphylaktische Beeinflussung von Schweine-Renin und Extrakt aus Rattennieren spricht für pharmacodynamisch ähnliche Eigenschaften der in den Rohpräparaten vorliegenden pressorisch wirksamen Prinzipien.

Im Gegensatz zu der in typischer Weise veränderten Blutdruckreaktion gegenüber Renin ist am nierenlosen Tier die Druckzunahme

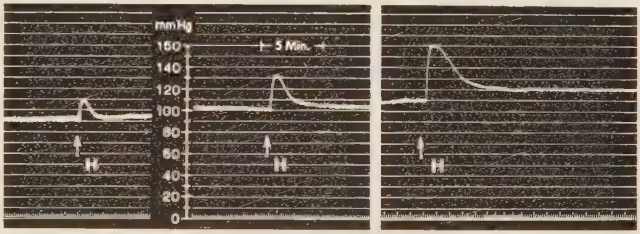


Abb. 6. Wirkung einer intravenösen Injektion von 0,005 mg/kg Hypertensin (H) an der intakten (links) und nephrektomierten Ratte (Mitte). Die dritte Kurve zeigt die Wirkung von 0,1 mg/kg Hypertensin an der nephrektomierten Ratte

nach Hypertensin nur quantitativ verstärkt und die Reaktion verläuft ähnlich wie nach Injektion von Adrenalin oder Nor-Adrenalin. Auch in Versuchen, in denen wesentlich höhere Dosen von Hypertensin (bis zu 0,1 mg/kg) injiziert wurden, war der Blutdruckanstieg nicht in der für Renin oder frischen Nierenextrakt typischen Weise verlängert (Abb. 6).

Besprechung der Ergebnisse

Nimmt man an, daß die pressorische Wirkung des von uns verwendeten Rohpräparates aus Schweinenieren und des frisch hergestellten Extraktes aus Rattennieren im wesentlichen auf deren Gehalt an Renin oder ähnlichen Stoffen zurückzuführen ist, so kommen für die nach Nierenentfernung verstärkte und verlängerte pressorische Wirkung im wesentlichen folgende Erklärungsmöglichkeiten in Betracht:

1. Wegfall der Ausscheidung bzw. der Eliminierung aus der Blutbahn durch die Niere.

2. Fehlen oder Verminderung von Hypertensinase, an der die Nieren besonders reich sind.

3. Wegfall anderer in der Niere gelegener, das Renin inaktivierender Mechanismen.

4. Zunahme des Renin-Substrates Hypertensinogen als Folge des Fehlens oder der Verminderung von endogenem Renin.

5. Bildung oder Anwesenheit einer nicht mit Renin identischen Substanz, die nur nach Nierenentfernung zur Blutdrucksteigerung führt, ähnlich dem sustained pressor principle von Helmer[8, 12].

Die verschiedenartige Beeinflussung des drucksteigernden Effektes der untersuchten Substanzen durch die Nierenentfernung spricht dafür, daß die Inaktivierung der zugeführten Stoffe nicht einfach gleichbedeutend mit ihrer Ausscheidung durch die Nieren ist. Für den Verlauf der Blutdrucksteigerung nach Adrenalin oder Nor-Adrenalin spielt die Entfernung der Niere bzw. die renale Ausscheidung eine untergeordnete Rolle im Vergleich zu anderen inaktivierenden Mechanismen. Ob für die Verlängerung der Pitressin-Wirkung der Wegfall der Ausscheidung (Ginsburg[3]) oder das Fehlen eines direkten inaktivierenden Mechanismus verantwortlich sind, ist auf Grund unserer Versuche nicht zu beantworten. Dagegen haben Heller u. Mitarb.[2, 7, 15] auf den inaktivierenden Effekt der Niere in bezug auf die antidiuretische Wirkung von Pitressin hingewiesen.

Der Wegfall der exkretorischen Funktion der Niere ist für den blutdrucksteigernden Effekt von Renin nicht von Bedeutung, da am Hund nach unilateraler Nephrektomie und Einbinden des Ureters der verbleibenden Niere in die vena cava keine Verstärkung der pressorischen Wirkung von injiziertem Renin auftritt (MacCubbin u. Page[10]).

Nach der heute herrschenden Auffassung setzt das Ferment Renin aus dem in der α_2-Globulinfraktion enthaltenen Hypertensinogen das Polypeptid Hypertensin frei, das durch Hypertensinase inaktiviert wird. Die Tatsache, daß die blutdrucksteigernde Wirkung von Hypertensin am nierenlosen Tier zwar verstärkt, jedoch nicht wesentlich verlängert ist, spricht dagegen, daß bei Entfernung der Niere ein Mechanismus wegfällt, der zugeführtes Hypertensin zerstört. Es ist bekannt, daß nicht nur die Nieren, sondern auch andere Organe Hypertensinase enthalten, so daß dem Ausfall der Nieren als Produzent der Hypertensinase keine ausschlaggebende Bedeutung für eine durch Hypertensin ausgelöste Blutdrucksteigerung zukommen dürfte. In frischem Nierenextrakt und in rohen Renin-Präparaten ist außerdem meist Hypertensinase enthalten und mit dem von uns verwendeten Renin ließ sich ebenso wie mit frischem Extrakt aus Rattennieren in vitro eine Inaktivierung von Hypertensin erzielen. Die Tatsache, daß trotz der in beiden Präparaten enthaltenen Hypertensinase am nierenlosen Tier eine starke und langdauernde Blutdrucksteigerung auszulösen ist, kann entweder in dem Sinne gedeutet werden, daß diese Menge von Hypertensinase ungenügend ist, um das gesamte, durch Renin in der Ratte gebildete Hypertensin zu zerstören oder aber daß Renin den Blutdruck noch auf andere Weise steigert als auf dem Umwege über die Freisetzung von Hypertensin.

Trotz zahlreicher Untersuchungen über Renin-inaktivierende Mechanismen der Niere ist bisher nichts Sicheres darüber bekannt. Goldblatt[4] hat angegeben, daß Renin durch Nierengewebe inaktiviert werden kann, ohne daß es zerstört wird und vermutet eine reversible Umwandlung in eine enzymatisch unwirksame Form. Entfernung der Niere würde in diesem Fall dazu führen, daß injiziertes Renin nicht mehr durch die Niere inaktiviert wird, sondern enzymatisch voll wirksam ist. Der langdauernde Blutdruckanstieg wäre dann durch eine kontinuierliche Freisetzung von Hypertensin zu erklären, da einmalige Injektion auch großer Hypertensindosen nicht zu dem plateau-förmigen Druckanstieg führt wie einmalige Gabe von Renin. Gegen die Annahme, daß die geringere drucksteigernde Wirkung von Renin bei Anwesenheit der Niere lediglich auf eine Verminderung oder Unterdrückung der enzymatischen Aktivität von Renin zurückzuführen ist, spricht die Tatsache, daß Renin nicht sofort nach Nierenentfernung zu verstärkter und verlängerter Drucksteigerung führt, sondern erst nach mehrstündiger Latenzzeit.

Es ist weiterhin diskutiert worden, daß nach Wegfall der endogenen Renin-Quelle das für dieses Enzym bestimmte Substrat nicht verbraucht wird, so daß zugeführtes Renin aus dem vermehrt vorhandenen Hypertensinogen größere Mengen von Hypertensin freisetzt. Zwar ist eine Zunahme von Hypertensinogen nach Nierenentfernung nachgewiesen worden[1], doch entspricht die verstärkte und verlängerte Renin-Reaktion am nierenlosen Tier nicht dem Kurvenverlauf nach Injektion auch großer Dosen von Hypertensin, so daß nicht anzunehmen ist, daß der verstärkten pressorischen Reaktion des nierenlosen Tieres vermehrte Hypertensinbildung zugrunde liegt.

Helmer u. Shipley[8, 12] haben einen pressorischen, aus der Niere stammenden Wirkstoff (sustained pressor principle) beschrieben, der nicht mit Renin oder Hypertensin identisch sein soll und an der nierenlosen Katze zu einer langdauernden Blutdrucksteigerung führt, die in ihrem Verlauf große Ähnlichkeit mit der von uns beobachteten Blutdruckreaktion nach Injektion von Renin oder Nierenextrakt an der nierenlosen Ratte besitzt. Neben der Annahme, daß es sich dabei um eine bisher unbekannte Substanz handelt, wird auch die Vermutung geäußert, daß Renin auf enzymatischem Wege außer Hypertensin noch andere, stabilere Substanzen bilden kann.

Möglicherweise ist das sustained pressor principle diejenige Form, in der Renin von den Nieren in das Blut abgegeben wird, jedoch ohne die Fähigkeit Hypertensin zu bilden[9]. Der Unterschied zwischen den Befunden von Helmer u. Shipley und unseren eigenen Versuchsergebnissen ist folgender: Während wir am nierenlosen Tier eine langanhaltende Blutdrucksteigerung direkt nach Injektion von Extrakt aus Rattennieren oder Renin finden, injizieren diese Autoren Nierenextrakt zunächst bilateral nephrektomierten Katzen und können dann im Plasma

der so vorbehandelten Tiere das sustained pressor principle bei Testierung an der nierenlosen Katze nachweisen, wogegen die intakte Katze nicht mit typischer Blutdrucksteigerung darauf reagiert. Ob bei der in unseren Versuchen beobachteten Verstärkung der pressorischen Wirkung von Renin oder Nierenextrakt dem sustained pressor principle eine Bedeutung zukommt, ist nicht auszuschließen, jedoch liegen keine Beweise für einen derartigen Erklärungsversuch vor.

Nicht nur die Anwesenheit der Nieren, sondern auch intraperitoneale Vorbehandlung des nierenlosen Tieres mit Renin oder Nierenextrakt verhindern die verstärkte und verlängerte Drucksteigerung nach Injektion von Renin oder Nierenextrakt, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, daß der Ausgangsblutdruck um durchschnittlich 30—40 mm Hg höher liegt als bei nicht intraperitoneal vorbehandelten Tieren. Der inaktivierende Effekt der Niere gegenüber pressorisch wirkenden Stoffen renalen Ursprungs ist somit *nicht* an das Vorliegen von funktionsfähigem Nierengewebe gebunden. Die Tatsache, daß unmittelbar nach Nierenentfernung die drucksteigernde Wirkung von injiziertem Renin noch nicht maximal verstärkt und verlängert ist, kann darauf zurückzuführen sein, daß noch vorhandene pressorische Substanzen im Organismus den Effekt von zugeführtem Renin abschwächen. Es wäre dann anzunehmen, das Anwesenheit von Renin — endogen gebildet oder exogen zugeführt — die Wirkung von Renin oder ähnlichen Substanzen auf den Blutdruck hemmt.

In diesem Sinne sprechen auch Befunde an Ratten mit experimenteller Hypertension nach Überdosierung von Cortexon und Kochsalz, bei denen sich keine pressorischen Substanzen mehr in den Nieren nachweisen lassen[6]. Diese Tiere reagieren auf injiziertes Renin mit ähnlich verstärkter und verlängerter Blutdrucksteigerung wie nierenlose Tiere. Noch fehlen die Unterlagen zum Verständnis dieses regulatorischen Mechanismus, um so mehr als Ort der Inaktivierung, Ausscheidung und Zerstörung von Renin unbekannt sind. Die von uns erhobenen Befunde sprechen jedoch dafür, daß die enzymatische Freisetzung von Hypertensin nicht die einzige Wirkung ist, die Renin auf den Blutdruck und dessen Regulation ausübt.

Summary

1. Experiments were carried out on intact and nephrectomised rats, in order to compare the pressor effects of adrenaline, nor-adrenaline, Pitressin, hog renin, a freshly prepared extract from rats' kidneys, and hypertensin.

2. In the nephrectomised animal, renin and rat-kidney extract produce a rise in blood pressure which, in comparison with the effect observed on intact rats, is characterised by a greater intensity and particularly by a more prolonged duration (several hours). Following

nephrectomy, the pressor effect of hypertensin is appreciably intensified, but only slightly prolonged. Pitressin occupies an intermediate position between renin and hypertensin, although its pressor action is less pronounced and of shorter duration than of renin. Nephrectomy produces only a slight intensification in the hypertensive effect of adrenaline and nor-adrenaline.

3. The more marked rise in blood pressure occurring in nephrectomised animals in response to the injection of renin is attributed to a lack of renin or of substances with renin-like properties. It is suggested that the enzymatic release of hypertensin is not the only means by which renin exerts its influence on the blood pressure.

Literatur

[1] Collins, D. A., and C. D. Harakal: Changes in Hypertensinase and Hypertensinogen following nephrectomy. Circulation (New York) **2**, 196 (1954). — [2] Dicker, S. E., and A. L. Greenbaum: The degree of inactivation of the antidiuretic activity of vasopressin by the kidneys and the liver of rats. J. of Physiol. **126**, 116 (1954). — [3] Ginsburg, M.: In: Hormonal control of water and salt-electrolyte metabolism in vertebrates. p. 121. Cambridge 1956. — [4] Goldblatt, H., H. Lamfrom and E. Haas: Physiological properties of renin and hypertensin. Amer. J. Physiol. **175**, 75 (1953). — [5] Gross, F., u. F. Sulser: Verstärkung und Normalisierung der blutdrucksteigernden Wirkung von Renin an der Ratte. Helvet. physiol. Acta **12**, C 75 (1954). — [6] Gross, F., u. F. Sulser: Pressorische Substanzen in den Nieren experimentell hypertonischer Ratten. Im Druck. — [7] Heller, H., and J. M. A. Zaidi: In: Hormonal control of water and salt-electrolyte metabolism in vertebrates. p. 34. Cambridge 1956. — [8] Helmer, O. M., and R. E. Shipley: Recovery of a pressor principle from the blood plasma of cats given kidney extracts. Amer. J. Physiol. **150**, 353 (1947). — [9] Helmer, O. M.: The relation of the sustained pressor principle to renin hypertension. CIBA found. symp. p. 148. London: J. and A. Churchill 1954. — [10] MacCubbin, I. W., and J. H. Page: Renal inhibition of pressor responsiveness to drugs. Circulation (New York) **2**, 35 (1954). — [11] Masson, G. M. C.: Potentiation of pressor activity of subcutaneous renin. Federat. Proc. **13**, 95 (1954). — [12] Shipley, R. E., O. M. Helmer and K. G. Kohlstaedt: The presence in blood of a principle which elicits a sustained pressor responsein nephrectomized animals. Amer. J. Physiol. **149**, 708 (1947). — [13] Tigerstedt, R., and P. G. Bergman: Niere und Kreislauf. Scand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **8**, 223 (1898). — [14] Wakerlin, G. E., and G. R. Chobot: A method for the bioassay of renin. Amer. J. Physiol. **126**, P. 646 (1939). — [15] Zaidi, S. M. A.: Inactivation of vasopressin by the kidney. J. of Endocrin. **12**, 2 (1954).

Dr. F. Gross, Wissenschaftl. Laboratorien d. Ciba AG, Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 348—359 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Die Wirkung von Theophyllin, Coffein und Theobromin auf Kontraktionskraft, Erregbarkeit, Refraktärzeit und Spontanfrequenz des isolierten Herzmuskels der Katze

Von

G. Kuschinsky und E. Muscholl

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Juni 1956)

Experimentelle Befunde über die Wirkung von Purinkörpern auf das Myokard leiten sich meist von Versuchen am Froschherz her. Abgesehen von methodischen Unzulänglichkeiten mancher älterer Experimente (Kritik solcher Versuche siehe bei Neuroth, Wezler u. Sieglitz) stehen der Übertragbarkeit der am Kaltblüter erhaltenen Resultate auf den Warmblüter zahlreiche Bedenken gegenüber.

Als Testobjekt für die inotrope Wirkung von Pharmaka hat der isolierte Papillarmuskel der Katze (Cattel u. Gold) besondere Vorzüge, wie Untersuchungen von Herzglykosiden [Sciarini, Ackerman u. Salter; White, Belford u. Salter; Loubatieres; Lee (1)], Sympathicomimetica [Krop; di Palma u. Mascatello (1); Garb; Lee (2)] oder Ionen [Garb (1, 2); Green, Giarman u. Salter] zeigen. Am isolierten Warmblütermyokard liegen zwar Befunde über die Veränderung der Kontraktilität durch Purinkörper (Krop; Lüllmann), aber keine Experimente über die Beeinflussung der Erregbarkeit oder der Refraktärzeit vor. Wir untersuchten daher die Wirkung von Theophyllin, Coffein und Theobromin auf diese drei Größen am Papillarmuskel und auf die Spontanfrequenz am Vorhofpräparat der Katze.

Methodik

Für die Versuche wurden 67 Papillarmuskeln, 12 linke Herzohren und 14 Vorhöfe vorwiegend junger Katzen verwendet. Die Tiere wurden entweder durch Nackenschlag oder durch einen Schußapparat getötet oder in Chloralosenarkose entblutet. Nach Excision des Herzens wurde in O_2-durchperlter Tyrodelösung zuerst der Vorhof oder das linke Herzohr abpräpariert und dann dem rechten Ventrikel die Papillarmuskeln entnommen. Die Anordnung der isolierten Organe zur *Messung der Kontraktionskraft* entsprach im wesentlichen dem Vorgehen von Cattell u. Gold: Papillarmuskel oder Herzohr wurden einseitig an einem Plexiglasschuh befestigt, der in ein 50 ml fassendes, O_2-durchperltes Organbad tauchte. Die andere Seite der Organe war durch einen Faden mit einem Spiegel-Torsionsmyographen verbunden, dessen Ausschläge in dem von uns gewählten Bereich linear mit der Kontraktionskraft zunahmen und die auf einem Photokymographion

registriert wurden. An zwei dem isolierten Herzteil anliegende Platinstifte wurde ein quer durch das Organ verlaufender Reizstrom (Rechteckimpulse von 5 msec, 48/min, > 6facher Schwellenwert) angelegt. Zu Beginn jedes Experimentes stellten wir die Empfindlichkeit des Myographen so ein, daß Papillarmuskeln oder Herzohren bei Reizung einen etwa gleichstarken Ausschlag an dem Photokymographion zeigten. Spontan arbeitende Papillarmuskeln oder Herzohren wurden verworfen. Sofern nicht anders angegeben, registrierten wir die Kontraktionen 1 min vor bis 1 min nach Gabe des Pharmakon, dann nach 5, 10 min usw., jeweils 1 min lang und drückten die Veränderungen der auf dem Papierfilm gemessenen Hubhöhe in Prozent des kurz vor der Gabe vorhandenen Ausgangswertes aus.

Die *Messung der Ruhe-Erregbarkeit* des Papillarmuskels erfolgte mit Hilfe von Reizzeit-Spannungskurven. Die Intensität einer Rechteckspannung (Frequenz 1 Hz) wurde kontinuierlich soweit gesteigert, bis mindestens 5 aufeinanderfolgende Reize den Muskel zur Kontraktion veranlaßten. Als Reizzeiten wurden hintereinander eingestellt: 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1 msec. Dann erfolgte die Messung des Schwellenwertes in umgekehrter Reihenfolge und so fort, bis von jeder Reizzeit 5—6 Werte erhalten waren. Die Reizung wurde im Bad durchgeführt. Obwohl somit ein Teil des Stromes außerhalb des Papillarmuskels floß, war die Streuung der Schwellenwerte gering. Unter unseren Bedingungen sank die Erregbarkeit während einer Meßperiode oft etwas ab. Die Höhe der jeweils an den Elektroden liegenden Spannung lasen wir nach Gleichspannungsverstärkung auf dem nachleuchtenden Schirm eines Kathodenstrahloszillographen (Tektronix, Typ 512) mit einer Kalibrierungseinrichtung ab. In dieser Weise durchgeführte Messungen erforderten für eine Reizzeit-Spannungskurve 25—35 min.

Zur *Bestimmung der Refraktärzeit* wurden drei verschiedene Verfahren angewendet: 1. Nach Dawes (1) ist die maximale Reizfrequenz, die das Organ gleichmäßig beantwortet, ein Maß für die Dauer der Refraktärperiode. Entsprechend dem Vorgehen dieses Autors reizten wir Papillarmuskeln mit Impulsen (5 msec, 1 Hz, > 6facher Schwellenwert) eines Reizgerätes und schalteten jeweils nach 2 min für 10 sec auf eine zweites Reizgerät um, dessen Frequenz variiert wurde. An Hand des Registrierfilmes ermittelten wir die Maximalfrequenz, die der Muskel mit gleichmäßigen Kontraktionen befolgte. 2. Ein Papillarmuskel wurde im Organbad gleichzeitig mit zwei Reizgeräten (5 msec, etwa 1 Hz, > 6facher Schwellenwert) gereizt, die in der Frequenz um 0,015—0,005 Hz verstimmt waren. Wir registrierten die Kontraktionen 2—4 min lang und zählten auf dem Papierfilm aus, wieviel Kontraktionen (von dem Zeitpunkt des gleichzeitigen Impulseinfalles an) durch den sich jeweils um 15—5 msec verzögernden zweiten Reiz unbeeinflußt blieben; die letzte einfache Kontraktion wurde als innerhalb, die erste doppelte als außerhalb der Refraktärzeit angesehen. 3. Papillarmuskeln wurden mit einer Grundfrequenz von 1 Hz gereizt und in variablem Abstand vom Reiz ein Testreiz gleicher Stärke eingefügt. Die erforderlichen Doppelrechteckimpulse erzeugten wir mit Hilfe eines Reizgerätes, dessen Ausgang mit einer Frequenz von 1 Hz einmal direkt und zum anderen über eine kontinuierlich regelbare Verzögerungsstufe ein zweites Gerät steuerte; letzteres diente zur Reizung des Papillarmuskels (5 msec, > 6facher Schwellenwert). Als Refraktärzeit ermittelten wir denjenigen größten Abstand des ersten vom zweiten (= Test-) Impuls, bei dem der Muskel noch eingipflige Kontraktionen (isometrisch-optische Registrierung) ausführte. Da der Testreiz weit über der normalen Reizschwelle lag, kann das bestimmte Intervall als absolute Refraktärzeit angesehen werden [Di Palma u. Mascatello (2)].

Die *Beeinflussung der Schlagfrequenz* maßen wir am spontan arbeitenden Vorhofpräparat; gleichzeitig wurde dessen Kontraktionskraft wie am Papillarmuskel registriert.

Alle Versuche wurden bei 37° C ausgeführt; die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung: 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g $CaCl_2$; 0,1 g $MgCl_2$; 1,0 g $NaHCO_3$; 0,05 g NaH_2PO_4; 1,0 g Glucose; Aqua dest. ad 1000 ml. Wir untersuchten die Wirkung von Theophyllinum purum, Coffeinum purum und Theobrominum purissimum[1]. Die ersten beiden Substanzen fügten wir in wäßriger Lösung (maximal 1/50 des Badvolumens) dem Organbad zu; die erforderlichen Konzentrationen von Theobromin in der Badflüssigkeit stellten wir dadurch her, daß wir 0,33 mg Theobromin pro Milliliter enthaltende Tyrodelösung von 37° C in das Organbad pipettierten.

Die zur statistischen Auswertung der Versuche benutzten Verfahren (*t*-Test, Covarianzanalyse) wurden nach Snedecor ausgeführt.

Ergebnisse

1. Kontraktionskraft. Theophyllin ($^1/_{32}$—$^1/_2$ mM/l) verursachte am Papillarmuskel in allen untersuchten Dosen bereits wenige Sekunden nach Zusatz zur Badflüssigkeit eine Zunahme der Kontraktionskraft, die

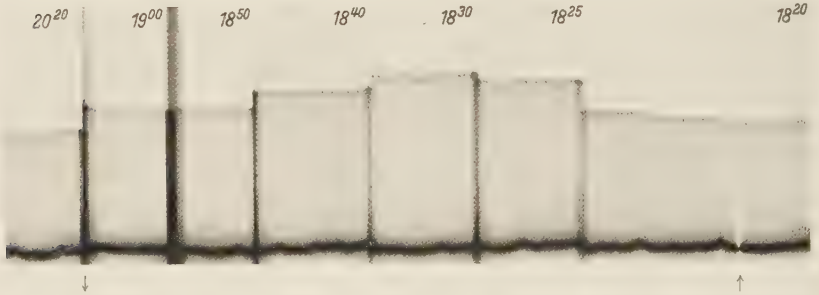


Abb. 1. Wirkung von Theophyllin am isolierten Katzenpapillarmuskel. Von rechts nach links zu lesen: Isometrisch-optische Registrierung der elektrisch ausgelösten Kontraktionen (48/min) zu den angegebenen Zeiten jeweils $^1/_2$—1 min lang. ↑ = Zusatz von Theophyllin ($^1/_8$ mM/l) zum Organbad; ↓ = 3 × Spülen 19^{01}—19^{05})

ihr Maximum nach 5–15 min erreichte und anschließend wieder etwas abfiel (siehe Abb. 1 u. 2). Die positiv inotrope Wirkung hielt dann aber in den bis zu $2^1/_2$ Std ausgedehnten Registrierungen ohne wesentliche Abnahme an. Tab. 1 zeigt den Verlauf des Effektes von $^1/_2$ mM/l Theophyllin über 20 min sowie als Streuungsmaß den mittleren Fehler des Mittelwertes (s_x). Nach Auswaschen mit Tyrodelösung stellte sich die ursprüngliche Kontraktionskraft wieder ein. Die Wirkung des Theophyllin konnte beliebig oft hintereinander hervorgerufen werden. Papillarmuskeln, die durch mehrere Stunden anhaltende Reizung „ermüdet" waren, sprachen auf gleiche Dosen von Theophyllin stärker an als solche, die eben dem Herzen entnommen waren. Da sich Coffein und Theobromin hinsichtlich der Abhängigkeit ihrer Effekte von dem Zustand des Präparates ebenso verhielten wie Theophyllin, wurde bei den Versuchen zur Ermittelung der

[1] Wir danken der Fa. Boehringer Sohn, Ingelheim, für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen.

Dosis-Wirkungskurven die Reihenfolge der an einem Papillarmuskel getesteten Substanzen und Dosen variiert. Auch in der Auswaschbarkeit und in dem Einsetzen der Wirkung unterschieden sich Coffein und Theobromin nicht von Theophyllin. Dagegen hielt der Effekt von Coffein weniger lange an (bei einer Dosis von $^1/_2$ mM/l z. B. nur 20—40 min) als

Tabelle 1. *Wirkung von Theophyllin auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels*

0 min	5 min	10 min	15 min	20 min
100	$170 \pm 13{,}3$	$172 \pm 13{,}0$	$158 \pm 17{,}0$	$153 \pm 13{,}9$

Zum Zeitpunkt 0 min: Gabe von $^1/_2$ mM/l Theophyllin; Kontraktionskraft in Prozent des Ausgangswertes (0 min). Mittelwerte aus 10 Versuchen $\pm s_{\bar{x}}$.

der von Theophyllin oder von Theobromin. Zur Aufstellung der Dosis-Wirkungskurven wurde der Mittelwert aus den 5 und 10 min nach Zusatz der Substanz registrierten Ausschlägen gebildet und aus den so erhaltenen Werten nach Logarithmieren der Dosen Regressionslinien errechnet (siehe Abb. 3, dort auch Versuchszahlen). Diese verglichen wir miteinander in bezug auf Abstand und Neigung mit Hilfe der Covarianzanalyse. Die Regressionskoeffizienten der den einzelnen Purinkörpern zugehörigen Regressionslinien wichen nicht signifikant voneinander ab. Im Abstand der Linien ergaben sich zwischen Theophyllin einerseits und Coffein sowie Theobromin andererseits gesicherte Unterschiede (siehe Tab. 2). Die Differenz zwischen Coffein und Theobromin liegt innerhalb des Zufallsbereiches. Somit erweisen sich die Dosis-Wirkungskurven als parallel; alle drei Purinkörper besitzen eine positiv inotrope Wirkung, die des Theophyllin ist signifikant stärker als die der anderen beiden Substanzen.

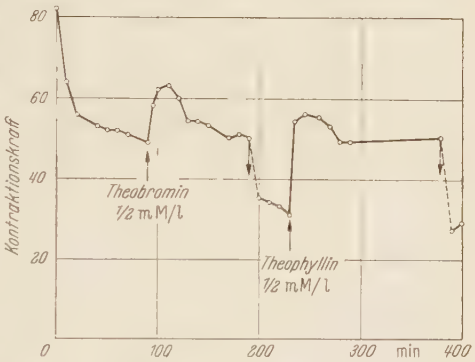


Abb. 2. Die positiv inotrope Wirkung von Theobromin und Theophyllin an einem Papillarmuskelpräparat. ↑ = Gabe, ⌇ Ausspülen der Substanz durch dreimaligen Badwechsel. Ordinate: Kontraktionskraft in Millimeter Höhe des auf dem Registrierfilm gemessenen Ausschlages des Myographen; Abszisse: Zeit in Minuten

In gleicher Weise wie am Papillarmuskel bestimmten wir auch an isolierten Herzohren den Einfluß von Theophyllin. Um nicht Störungen durch spontan einsetzende Kontraktionen zu erhalten, wurden nur linke, nicht zu Spontanrhythmik neigende Herzohren verwendet. Eintritt und Dauer der Theophyllinwirkung, Auswaschbarkeit der Effekte und stärkeres Ansprechen „ermüdeter" Präparate waren am isolierten Herzohr

Tabelle 2. *Statistische Sicherung der Unterschiede in Abstand (A) und Regressionskoeffizient (b) der Dosis-Wirkungskurven von Papillarmuskeln und Herzohren*

			Papillarmuskel		Herzohr
			Coffein	Theobromin	Theophyllin
Papillarmuskel	Theophyllin	A	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	0
		b	0	0	$P < 0{,}01$
	Theobromin	A	0		
		b	0		

P-Werte nach der F-Verteilung bestimmt; 0 = P-Wert $> 0{,}05$. Regressionslinien und Versuchszahlen vgl. Abb. 2.

ebenso wie am Papillarmuskel zu beobachten. In der oben beschriebenen Weise wurde für Theophyllin ($^1/_{16}$—$^1/_2$ mM/l) auch am Herzohr eine Dosis-Wirkungskurve aufgestellt; sie verläuft signifikant steiler als die von Theophyllin am Papillarmuskel (siehe Tab. 2 und Abb. 3). Die Ruhespannung von Papillarmuskel oder Herzohr (von manchen Autoren auch als „diastolische Spannung" bezeichnet) veränderte sich unter dem Einfluß der Purinkörper nicht. Manchmal reagierten Papillarmuskeln auf Gabe einer Substanz mit Spontanrhythmik: Bei einer Theophyllindosis von $^1/_2$ mM/l in 4 von 40 Fällen, bei $^1/_4$ mM/l in 0 von 22, bei $^1/_8$ mM/l in 1 von 18 Versuchen, bei kleineren Dosen keine Spontantätigkeit; bei Coffein nur in einem Versuch von 12 und einer Dosis von $^1/_8$ mM/l.

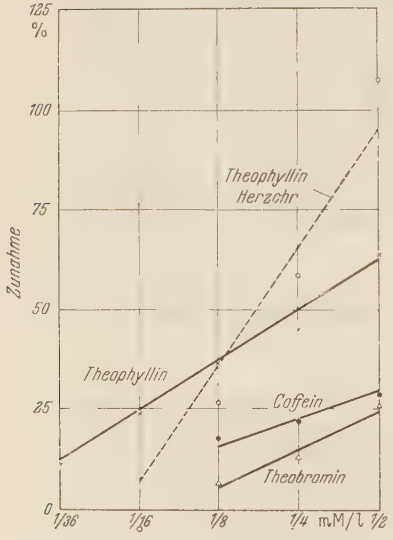


Abb. 3. Dosis-Wirkungskurven von Theophylin (×), Coffein (•) und Theobromin (▲) am Papillarmuskel sowie Theophyllin am Herzohr (○, gestrichelte Linie). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus mindestens 8, durchschnittlich 14 Bestimmungen. Ordinate: Zunahme der Kontraktionskraft in Prozent, Abszisse: Dosis in mM/l in logarithmischer Auftragung

2. Erregbarkeit. Reizzeit-Spannungskurven unbehandelter Papillarmuskeln, die im Abstand von einigen Stunden gewonnen wurden, zeigten eine zunehmende Steigerung der Erregbarkeit an, die sich in zunehmendem Absinken des Schwellenreizes äußerte; wurden jedoch zwei Reizzeit-Spannungskurven unmittelbar hintereinander bestimmt, so traten keine signifikanten Differenzen bei Reizzeiten von 0,1—5 msec auf (siehe Tab. 3). Bei den in der Folge beschriebenen Versuchen setzten wir daher die zu prüfenden Substanzen sofort nach Aufstellung einer Reizzeit-Spannungskurve dem Organbad in einer Dosis von $^1/_2$ mM/l zu und begannen nach 5 min Einwirkungszeit

mit der Bestimmung einer neuen Reizzeit-Spannungskurve. Zur statistischen Auswertung wurden für jede Reizzeit die gepaarten Differenzen zwischen der Schwellenspannung vor und nach Behandlung gebildet und mit Hilfe des t-Testes geprüft, ob deren Mittelwerte von Null abwichen. Theophyllin bewirkte eine signifikante

Tabelle 3. *Veränderungen der Schwellenreizspannung des Papillarmuskels bei verschiedenen Reizzeiten*

	Anzahl der Papillarmuskel	Reizzeit in msec						
		10	5	2	1	0,5	0,2	0,1
Keine Zugabe	5	$\downarrow P<0{,}05$	0	0	0	0	0	0
Theophyllin $^1/_2$ mM/l	5	0	0	$\downarrow P<0{,}05$	$\downarrow P<0{,}02$	$\downarrow P<0{,}01$	$\downarrow P<0{,}001$	$\downarrow P<0{,}001$
Coffein $^1/_2$ mM/l	3	0	$\uparrow P<0{,}05$	0	0	0	0	0
Theobromin $^1/_2$ mM/l	3	0	0	$\uparrow P<0{,}01$	$\uparrow P<0{,}001$	$\uparrow P<0{,}05$	$\uparrow P=0{,}05$	$\uparrow P<0{,}05$

Pro Papillarmuskel und Reizzeit 5—6 Messungen vor und nach Gabe der Substanz. $\downarrow$ = Senkung, $\uparrow$ = Steigerung des Schwellenwertes, dazugehöriger P-Wert mit t-Test ermittelt; 0 = P-Wert $> 0{,}05$.

Steigerung der Erregbarkeit bei Reizzeiten von 0,1—2 msec (siehe Tab. 3). Ein Einzelversuch ist in Abb. 4 dargestellt. An den Mittelwerten der Schwellenreizspannung und dem Streuungsmaß des mittleren Fehlers des Mittelwertes ist zu erkennen, daß bei den kurzen Reizzeiten ein deutlicher Unterschied besteht, während bei Reizzeiten von 1 msec und mehr die Mittelwerte so nahe beieinander liegen, daß sich die Streuungsbereiche fast überschneiden. Erst die Steigerung der Anzahl der Einzelbeobachtungen durch mehrere derartige Versuche erlaubte die statistische Sicherung der Unterschiede, wie in Tab. 3 angegeben.

Coffeinzusatz hatte keine signifikanten Veränderungen der Schwellenreizspannung zur Folge, abgesehen von einer Steigerung bei der Reizzeit von 5 msec. Theobromin dagegen senkte die Erregbarkeit in demselben Bereich von Reizzeiten, in dem Theophyllin die Erregbarkeit steigerte.

3. Refraktärzeit. Mit dem Verfahren von Dawes (1) untersuchten wir nur die Wirkung von Theophyllin ($^1/_2$ mM/l): Die maximale Frequenz, die der Papillarmuskel mit gleichmäßigen Kontraktionen befolgte, war unter unseren Bedingungen im Mittel 5,1 Hz; nach Gabe von Theophyllin stieg

die Frequenz im Durchschnitt um 22 % an (9 Versuche). Der Unterschied ist signifikant ($P < 0{,}01$). Auch mit der zweiten Methode, die in schrittweisem Vorrücken eines zunächst in die Refraktärperiode und schließlich außerhalb derselben einfallenden zweiten Reizes bestand, wurde nur der Effekt von $^1/_2$ mM/l Theophyllin geprüft: Die Substanz bewirkte in 9 Versuchen im Durchschnitt eine 17 % ige signifikante Abnahme der Refraktärzeit ($P < 0{,}001$). Das dritte Verfahren (Grundfrequenz 1 Hz,

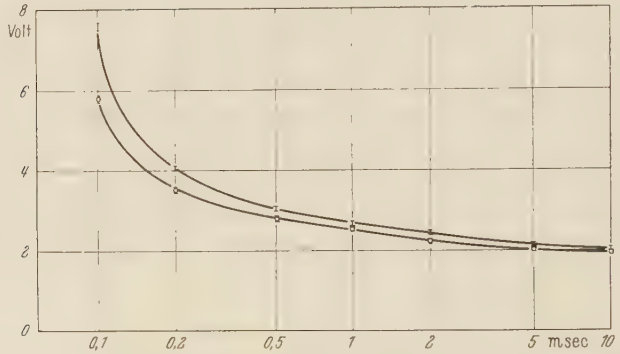


Abb. 4. Reizzeit-Spannungskurve eines Papillarmuskels vor (·) und nach (•) Theophyllin (½ mM/l). Mittelwerte aus 5 Bestimmungen $\pm s_{\bar{x}}$. Ordinate: Spannung in V, Abszisse: Reizzeit in msec, logarithmischer Maßstab

variabler Abstand des Testreizes) benutzten wir, um alle drei Purinkörper zu untersuchen: Theophyllin ergab die stärkste Abnahme der absoluten Refraktärzeit, Coffein war nicht ganz so wirksam (siehe Tab. 4). Theobromin hatte keinen signifikanten Effekt. Die absoluten Werte der Refraktärperiode, die vor der Gabe einer Substanz gemessen wurden, schwankten von 137—201 msec und betrugen in 29 Bestimmungen zu jeweils 10 Einzelmessungen im Mittel 171 $\pm$ 2,8 msec ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). An ein und demselben Papillarmuskel bestimmt, wies die Refraktärzeit aber geringere Streuungen auf.

Tabelle 4. *Veränderungen der absoluten Refraktärperiode des Papillarmuskels*

	Anzahl der Papillarmuskeln	Durchschnittliche Änderung der Refraktärperiode in Prozent ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)	t-Test ergibt
Theophyllin $^1/_2$ mM/l	4	— 9,71 $\pm$ 0,746	$P < 0{,}001$
Coffein $^1/_2$ mM/l	4	— 5,45 $\pm$ 1,07	$P < 0{,}001$
Theobromin $^1/_2$ mM/l	4	— 1,94 $\pm$ 1,03	$P > 0{,}05$

An jedem Papillarmuskel wurden 10 Messungen vor und ebensoviel nach Gabe der Substanz durchgeführt.

4. Spontanschlag. Am spontan arbeitenden Vorhofpräparat wirkten die Purinkörper in allen untersuchten Dosen positiv ino- und chronotrop (siehe Abb. 5). Zur Auswertung der Effekte (pro Dosis mindestens acht) gingen wir ähnlich vor, wie es für die Kontraktionskraft des Papillarmuskels geschildert wurde: Die Mittelwerte der 3 und 6 min nach Zusatz der Substanz zum Organbad gemessenen Veränderungen der Frequenz (bzw. Kontraktionskraft) in Prozent dienten zur Errechnung von Regressionslinien, wobei die Dosen logarithmiert wurden. Die für jeden der drei Purinkörper gesondert vorgenommene Prüfung mit der Covarianzanalyse ergab, daß ein signifikanter Unterschied in Abstand oder Neigung der Regressionslinien für die Frequenz und die Kontraktionskraft nicht bestand (P in allen drei Vergleichen $> 0{,}05$). Die positiv ino- und chronotrope Wirkung ging also in unseren Versuchen parallel. In der Wirkung auf die Kontraktionskraft zeigte sich zwischen Theophyllin und Coffein eine eben nachweisbare Differenz im Abstand der Regressionslinien ($P = 0{,}05$), ebenso bei der Spontanfrequenz ($P < 0{,}05$). Dagegen bestand zwischen Theophyllin und Theobromin hinsichtlich der Kontraktionskraft oder der Frequenz kein Unterschied ($P > 0{,}1$ bzw. $P > 0{,}05$).

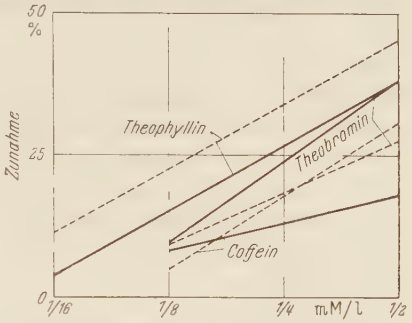


Abb. 5. Dosis-Wirkungskurven von Theophyllin, Coffein und Theobromin am spontan schlagenden Vorhofpräparat. Ordinate: Zunahme der Kontraktionskraft (————) und Spontanfrequenz (— — —) in Prozent, Abszisse: Dosis in mM/l in logarithmischer Auftragung. Einzelheiten siehe Text

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die in unseren Versuchen verwendeten Konzentrationen von Theophyllin liegen im Bereich der Blutkonzentrationen, die am Menschen bei therapeutischen Dosen gemessen wurden. So fanden Truitt, McKusick u. Krantz bei intravenöser Gabe von 0,56 g Aminophyllin pro 70 kg nach $^1/_4$ bzw. 1 und 2 Std im Blut $^1/_{15}$ bzw. $^1/_{20}$ und $^1/_{24}$ mM/l an Theophyllin. Dieselbe Dosis führte nach Verabreichung per os zu einem mehrere Stunden anhaltenden Theophyllin-Blutspiegel von $^1/_{30}$ mM/l. Die kleinste von uns untersuchte, am Papillarmuskel sicher positiv inotrop wirksame Konzentration von Theophyllin war $^1/_{32}$ mM/l ($= 1:1{,}8 \cdot 10^5$). Die höchste Konzentration ($^1/_2$ mM/l $= 1:1{,}1 \cdot 10^4$) überstieg den am Menschen nach intravenöser Verabreichung gemessenen Theophyllin-Blutspiegel um das 7—8fache; jedoch ist von in physiologischen Salzlösungen suspendierten Organen bekannt, daß die zur Auslösung eines Effektes notwendigen

Konzentrationen eines Pharmakon häufig größer sind als am durchbluteten Organ.

Die Wirkung von Theophyllin, Coffein und Theobromin auf die Kontraktionskraft des Katzenpapillarmuskels prüfte bereits Krop in einer noch sechs weitere Substanzen umfassenden Untersuchung. Die von ihm gewählten Konzentrationen lagen weit über den von uns benutzten. Nur im Falle des Theophyllins wurden als niedrigste Dosen $1:2 \cdot 10^4$ und $1:10^4$ verwendet, die unseren höchsten Konzentrationen entsprechen. Im Gegensatz zu unserer Beobachtung, daß der positiv inotrope Effekt über die mehrere Stunden betragende Beobachtungszeit nachzuweisen ist, fand Krop nur eine Wirkungsdauer von 11—20 min (je 4 Versuche, vgl. dazu die statistische Sicherung unserer Effekte in Tab. 1). Experimentelle Unterschiede, die unsere gegensätzlichen Befunde erklären könnten, bestanden nur darin, daß Krop Locke- und wir Tyrodelösung als Badflüssigkeit verwendeten. Im Hinblick auf die Zunahme der Kontraktionskraft bei diesen Dosen, den Eintritt und die Auswaschbarkeit der Wirkung sowie das gelegentliche Auftreten von Spontanrhythmik decken sich unsere Beobachtungen mit den Befunden von Krop. Jedoch können wir uns seiner Schlußfolgerung „The xanthines are ineffectual exept in concentrations considerably above those attainable therapeutically" nicht anschließen.

Am Papillarmuskel des Rattenherzens konnte Lüllmann weder mit Theophyllin noch mit Coffein eine positiv inotrope Wirkung erzielen. So ergibt sich in der Reaktion des Papillarmuskels auf Theophyllin die gleiche Speciesdifferenz wie am Herz-Lungen-Präparat: Lüllmann beobachtete an der Ratte überwiegend Abnahmen des Minutenvolumens; Härtelder u. Kuschinsky (in Vorbereitung) fanden dagegen an der Katze Steigerungen des Minutenvolumens, unabhängig vom Einfluß einer gleichzeitig vorhandenen Frequenzerhöhung.

Das Ausmaß der Kontraktionsverbesserung, die am Papillarmuskel durch Theophyllin erzielt werden kann, ist vergleichsweise viel geringer als nach Gaben von Herzglykosiden in therapeutischen Dosen (Cattel u. Gold). Auch sahen wir im Gegensatz zu Versuchen mit Strophanthin (unveröff. Befunde) nie, daß ein mehrere Stunden gereizter Papillarmuskel durch Purinkörper die zu Beginn des Experimentes gemessene Kontraktionskraft wiedergewann.

Aus der älteren Literatur über die Wirkung von Purinkörpern am isolierten Warmblüterherzen in der Anordnung nach Langendorff (Übersicht bei Lüllmann; Krop) ergab sich meist eine gleichzeitige Steigerung der Frequenz und der Amplitude des Herzschlages. Unsere Versuche am isolierten Vorhofpräparat haben analoge Ergebnisse: Zunahme von Frequenz und Kontraktionskraft laufen bei allen drei Substanzen parallel. Unsere Befunde mit Purinkörpern bestätigen die Erfahrung, die di Palma u. Mascatello [1951 (1)] mit Adrenalin am isolierten Vorhof und Papillarmuskel der Katze oder

Mendez u. Mendez mit Herzglykosiden am Hundeherz in situ machen konnten: Vorhof und Myokard werden von Pharmaka oft in verschiedener, ja sogar gegensätzlicher Weise beeinflußt. Auch der signifikant steilere Verlauf der Dosis-Wirkungskurve von Theophyllin am isolierten Herzohr gegenüber der am Papillarmuskel gewonnenen zeigt dies deutlich.

Bei Bestimmung der Erregbarkeit traten bei 5 und 10 msec dauernder Reizung anscheinend größere Unsicherheiten der Schwellenwertmessung auf, da signifikante Veränderungen der Erregbarkeit durch Theophyllin oder Theobromin nur bei den kurzen Reizzeiten von 0,2—2 msec gesehen wurden (vgl. Tab. 3). Auch fallen als einzige Werte aus den sonst einheitlichen Versuchsreihen der Kontrollen und des Coffein die Ergebnisse bei der Reizzeit 10 bzw. 5 msec heraus. Die am isolierten Vorhof der Katze aufgestellten Reizzeit-Spannungskurven werden unter der Wirkung von Adrenalin ebenfalls nur bei den kurzen Reizzeiten deutlich gesenkt, wie di Palma u. Mascatello [1951 (1)] mitteilen. Auf Grund unserer Versuche können wir den Befund von Greiner u. Garb, daß Aminophyllin die Schwellenstromstärke (Impulsbreite 5 msec) am Papillarmuskel herabsetzt, dahingehend erweitern, daß auch Theophyllin allein eine Erregbarkeitssteigerung hervorruft.

Um die Veränderung der Refraktärzeit durch Theophyllin zu messen, benutzten wir anfangs das häufig angewandte und technisch einfache Verfahren von Dawes (1). Diese Methode stellt jedoch nur einen Behelf dar, wie Dawes (2) selbst äußerte. Tatsächlich erhielten wir bei der Bestimmung der Refraktärperiode mit dem direkten Verfahren der Reizung durch Doppelimpulse ein quantitativ abweichendes Resultat und verließen daher die erstgenannte Methode.

Aus unseren Versuchen folgt, daß Kontraktionskraft, Erregbarkeit, Refraktärperiode und Spontantätigkeit durch jeden der drei Purinkörper keineswegs gleichsinnig oder gar in gleichem Ausmaß verändert werden. Auf unterschiedliche Beeinflussung dieser Größen hatten für die Wirkung von Ionen Garb (1951 [2]) und für die von Enzyminhibitoren Gardner u. Farah aufmerksam gemacht.

Summary

In the electrically driven papillary muscle of the cat's right ventricle theophylline, caffeine and theobromine exerted a positive inotropic action. Log. dose-effect regression lines for the three drugs were parallel; the effect of theophylline was significantly greater than those of caffeine and theobromine. The range of concentrations used was $^1/_{32}$—$^1/_2$ mM/l.

In the spontaneous beating atrium of the cat the purines enhanced both rate and force of contractions; differences in action between theophylline and the other drugs studied were not as pronounced as in papillary muscle.

Threshold determinations were performed in papillary muscles and strength-duration curves were plotted. Excitability was increased by theophylline and diminished by theobromine. Caffeine did not produce any significant effect.

The refractory period of the myocardium was shortened by theophylline and to a lesser extent by caffeine; it was not altered by theobromine. Occasionally spontaneous beating occured in papillary muscles when high doses of theophylline were added.

The significance of the results is discussed and findings concerning contractility are compared to those obtained by other authors under similar conditions.

Frl. Hildegard Wagner danken wir für ihre verständnisvolle Mitarbeit.

Literatur

Cattell, McK., and H. Gold: The influence of digitalis glucosides on the force of contraction of mammalian cardiac muscle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **62**, 116 (1938). — Dawes, S. G.: (1) Synthetic substitutes for quinidine. Brit. J. Pharmacol. **1**, 90 (1946). — (2) Experimental cardiac arrhythmias and quinidine-like drugs. Pharmacol. Rev. **4**, 43 (1952). — Di Palma, J. R., and A. V. Mascatello: (1) Analysis of the actions of acetylcholine, atropine, epinephrine and quinidine on heart muscle of the cat. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **101**, 243 (1951). — (2) Excitability and refractory period of isolated heart muscle of the cat. Amer. J. Physiol. **164**, 589 (1951). — Garb, S.: (1) The effects of potassium, ammonium, calcium, strontium and magnesium on the electrogram and myogram of mammalian heart muscle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **101**, 317 (1951). — (2) Seperatibility of contractile force and irritability in mammalian heart muscle. Amer. J. Physiol. **164**, 234 (1951). — (3) Effects of epinephrine, arterenol and isupriel on the electrical potentials of mammalian heart muscle: Inability of nitrites to block effects. Amer. J. Physiol. **172**, 399 (1953). — Gardner, E. A., and A. Farah: The action of some enzyme inhibitors on the isolated rabbit auricle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 255 (1955). — Green, J. P., N. J. Giarman and W. T. Salter: Combined effects of calcium and potassium on contractility and excitability of the mammalian myocardium. Amer. J. Physiol. **171**, 174 (1952). — Greiner, T., and S. Garb: The influence of drugs on the irritability and automaticity of heart muscle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 215 (1950). — Krop, S.: The influence of "heart stimulants" on the contraction of isolated mammalian cardiac muscle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **82**, 48 (1944). — Lee, K. S.: (1) A new technique for the simultaneous recording of oxygen consumption and contraction of the muscle: The effect of ouabain on cat papillary muscle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 304 (1953). — (2) The simultaneous recording of oxygen uptake and contraction of papillary muscles as affected by l-epinephrine and l-norepinephrine. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 313 (1953). — Loubatieres, A.: Méthodes d'étude et pharmacodynamie des substances cardiotoniques. J. de Physiol. **43**, 517 (1951). — Lüllmann, H.: Die

Wirkung von Coffein und Theophyllin auf den Herzmuskel. Arch. Kreislaufforsch. **23**, 11 (1955). — Mendez, R., and C. Mendez: The action of cardiac glycosides on the refractory period of heart tissues. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 24 (1953). — Neuroth, G., K. Wezler u. G. Sieglitz: Die Wirkung der Purine und Substituenten auf die Dynamik des isolierten, spontan schlagenden Froschherzens. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 378 (1953). — Sciarini, L. J., E. M. Ackerman and W. T. Salter: The response of isolated hypodynamic myocardium to inotropic drugs. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 432 (1948). — Snedecor, G. W.: Statistical Methods, 4th ed., Ames, Iowa: State College Press 1948. — Truitt, E. B., V. A. McKusick and J. C. Krantz jr.: Theophylline blood levels after oral, rectal and intravenous administration, and correlation with diuretic action. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **100**, 309 (1950). — White, W. F., J. Belford and W. T. Salter: Isodynamic equivalents of digitoxin congeners as tested on hypodynamic myocardium. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 443 (1948).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Mainz, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 360—365 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. F. Heim)

Der Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff auf die Ferment- und Co-Enzym A-Aktivität der Leber

Von
Fritz Heim, Fred Leuschner und Alfred Ott*

(Eingegangen am 15. Juni 1956)

Der Einfluß des Tetrachlorkohlenstoffes bzw. der durch diätetische Maßnahmen hervorgerufenen Leberverfettung auf die Aktivität von Leberfermenten wurde mehrfach untersucht. Christie u. Judah, die nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung an Leberschnitten von Ratten eine Hemmung der Gewebsatmung beobachteten, erklären diese auf Grund von Versuchen an Lebermitochondrien nicht mit der spezifischen Hemmung einzelner Fermente, sondern mit einer strukturellen Desorganisation der geordneten Enzymsysteme der Mitochondrien. Nach Frunder u. Friedel sind bei Fettlebern die DNP-haltigen Enzyme (Dehydrogenasen) am stärksten geschädigt. Richter u. Hove und Hardin fanden nach Vorbehandlung mit kleinen Tetrachlorkohlenstoffmengen den Q_{O_2} der Leberschnitte erhöht. Chen sowie Brown u. Harrison, Adams u. Roe, Bruns u. Neuhauer beobachteten bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung bzw. der diätetisch erzeugten Leberverfettung Aktivitätsabnahmen der Aldolase, Katalase, Phosphatase und Esterase der Leber. Die Hemmung der Esteraseaktivität wurde mit der Leberverfettung in ursächlichen Zusammenhang gebracht.

In vorliegender Arbeit wurde der Einfluß der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung auf die Atmung und gleichzeitig auf den Co-EnzymA-Gehalt der Leber untersucht. Co-EnzymA ist ein integrierender Faktor der Zellatmung, weil die Überführung der Kohlenhydrate und Fette in den Citronensäurecyclus und damit die Endoxydation dieser Stoffe im wesentlichen über das Co-Enzym A erfolgt. Außerdem könnte zwischen Co-Enzym A-Mangel und der Leberverfettung ein ursächlicher Zusammenhang bestehen. Neben dem Q_{O_2} der Leber wurde auch die Sauerstoffaufnahme von Nierenschnitten der gleichen Tiere bestimmt. Zur Beurteilung des Einflusses von Tetrachlorkohlenstoff auf andere an der Atmung nicht direkt beteiligte und für die Entgiftungsfunktion der Leber wichtige Enzyme wurde die Aktivität der Aminoxydase und der Novocainesterase normaler und mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteter

* D 29.

Lebern miteinander verglichen. Die Aminoxydase inaktiviert und entgiftet intermediär entstandene und aus dem Darm resorbierte Amine durch Desaminierung und gleichzeitige Oxydation zum Aldehyd. Novocainesterase inaktiviert durch Hydrolyse Benzoesäureester.

Methodik

Die zu den Versuchen verwendeten 400—800 g schweren Meerschweinchen erhielten, soweit sie nicht als Kontrolltiere dienten, 0,4 ml/100 g Tetrachlorkohlenstoff intramuskulär. Sie wurden 36 Std später durch Nackenschlag getötet. Einzelne Tiere starben schon vorher, andere, mit 0,4 ml/100 g behandelte aber zu Versuchen nicht benutzte Tiere überlebten die Vergiftung.

Bestimmung des Q_{O_2}. Aus den Lebern und Nieren wurden mindestens sechs 0,2—0,4 mm dicke Schnitte angefertigt. Ihre Sauerstoffaufnahme wurde in der Warburgapperatur in reiner Sauerstoffatmosphäre bei 37,5° C gemessen. Die Nährlösung bestand aus $\frac{M}{30}$ Phosphatpuffer $p_H = 7{,}4$. Zu 1000 ml des Phosphatpuffers wurden 6.32 g NaCl, 0,9 KCl, 0,066 $CaCl_2$ und 0,102 g $MgCl_2$ zugesetzt. Als Atmungssubstrat dienten Glucose in drei Konzentrationen, 0,005, 0,015 und 0,025 mol. und ein isomolares Gemisch aus Natriumpyruvat und Natriumsuccinat in drei Konzentrationen, 0,01, 0,025 und 0,045 mol. Der Q_{O_2} der Schnitte jeder Leber und Niere wurde in Gegenwart der drei verschiedenen Glucose und Pyruvat-Succinatkonzentrationen untersucht.

$$Q_{O_2} = \frac{O_2\text{-Aufnahme in mm}^3}{\text{Trockengewicht in mg} \cdot \text{Std}}$$

Co-Enzym A-Bestimmung: Die Lebern gelangten etwa 30 sec nach der Dekapitation in einen Mörser mit flüssiger Luft. Eine fein zerriebene Menge Leber wurde mit der gleichen Menge Wasser versetzt und unter ständigem Rühren zum Sieden erhitzt, daraufhin unter fließendem Wasser abgekühlt und in ein vorbereitetes Eisbad gebracht. Nach 2 min Homogenisieren bei etwa 20 000 Umdrehungen/min wurde das denaturierte Eiweiß abzentrifugiert. In dem so gewonnenen Kochsaft erfolgt die Bestimmung des Co-Enzym A mit der von Lynen u. Mitarb. modifizierten Methode nach Kaplan u. Lipmann. Die Mengenangaben erfolgten in μ Mol/g Frischgewebe, bezogen auf Co-Enzym A-SH.

Die Aktivität der Aminoxydase wurde in der Warburgapperatur in reiner Sauerstoffatmosphäre bestimmt. Zu 0,5 ml Leberhomogenat und 2 ml $\frac{m}{1{,}5}$ Phosphatpuffer + 1 mg NaCN wurde als Substrat 3,5 mg Tyramin in 0,5 ml H_2O gegeben und anschließend der Sauerstoffverbrauch während 30 min gemessen. Die fermentative Hydrolyse des Novocain wurde ebenfalls in der Warburgapperatur in 95%igem Stickstoff — 5%iger Kohlendioxydatmosphäre manometrisch bestimmt. Zu 0,5 ml Leberhomogenat + 2 ml Krebs-Ringer-Lösung wurde als Substrat 5,4 mg = 0,02 m Mol Novocain in 0,5 ml H_2O gegeben und anschließend das während 30 min gebildete CO_2 gemessen. In jedem Versuch muß die durch 0,02 m Mol Paraaminobenzoesäure aus der Homogenat-Krebs-Ringer-Lösung freigesetzte CO_2-Menge gesondert bestimmt werden. Sie entspricht der 100%igen Hydrolyse von 0,02 m Mol Novocain und dient als Bezugsgröße für die Novocainspaltung. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Versuchsreihen an normalen und Tetrachlorkohlenstoff geschädigten Organen wurden auf ihre Signifikanz durch Berechnung der Wahrscheinlichkeit P der Abweichung t geprüft. Als signifikant werden in biologischen Versuchen Unterschiede angesehen, bei denen P = 0,05 oder weniger beträgt.

Versuche

Die histologischen Befunde (nach Hämatoxylin-Sudanfärbung) ergaben das charakteristische Bild der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. In der Leber findet man zentrale Nekrose bei verschiedenen Graden fein- bis grobtropfiger Verfettung der erhaltenen Parenchymreste. Die Nierenschnitte zeigen ein Anfangsstadium der Nephrose mit Granulierung und Vacuolisierung der Tubulusepithelien und Eiweißmassen in den Tubuluslichtungen.

Die weiteren Befunde an normalen und geschädigten Lebern wurden in der Tab. 1 (Mittelwerte aus 20 Einzelbeobachtungen) zusammengestellt. Für normale Leberschnitte ist bereits eine 0,005 molare Glucosekonzentration optimal, da durch Erhöhung der Zuckermenge der Q_{O_2} nicht

Tabelle 1

	Q_{O_2} der Leberschnitte						CoA—SH µMol/g Frischleber	Tyraminoxydation in 30 min mm^3 O_2	Novocainhydrolyse in-% der Totalhydrolyse in 30 min
	Glucose Mol/l			Pyruvat + Succinat Mol/l					
	0,005	0,015	0,025	0,01	0,025	0,045			
Normal . .	5,8	5,9	5,6	12,1	15,6	19,8	0,15	277	84
CCl_4-geschädigt	6,2	6,0	5,9	10,9	11,2	12,9	0,052	95	45
Abnahme in % . .	—	—	—	10	28	35	65	66	46
t	0,9	0,5	0,5	1,5	2,7	3,1	6	6,7	6,4
P	0,4	0,6	0,6	0,2	0,02	0,01	$< 0{,}001$	$< 0{,}001$	$< 0{,}001$

gesteigert werden kann. Auch in vivo führt nach den Beobachtungen von Wik u. Drury die Erhöhung der Zuckerkonzentration im Blut selbst auf das 6—10fache der Norm nur zu einer mäßigen Zunahme der Glucoseoxydation. Bei Verwendung von Brenztraubensäure und Bernsteinsäure statt Glucose als Atmungssubstrat steigt der Q_{O_2} auf das 2,2fache an. Erhöhung der Brenztraubensäure- und Bernsteinsäurekonzentration von 0,01 auf 0,025 bzw. 0,045 Mol/l bedingt einen weiteren Anstieg um 33 bzw. 64%. Die Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff führt in den Versuchen mit Glucose — unabhängig von der verwendeten Substratkonzentration — zu keiner signifikanten Änderung des Q_{O_2}. Bei Verwendung von Brenztrauben- und Bernsteinsäure als Atmungssubstrat liegt der Q_{O_2} der mit Tetrachlorkohlenstoff geschädigten Leberschnitte, abhängig von der angewandten Substratkonzentration, 10—35% unter dem normaler Leberschnitte. Die Aktivität der Fermente nimmt meist mit Erhöhung der Substratkonzentration zu, ebenso auch die Empfindlichkeit gegenüber inaktivierenden Eingriffen. So tritt auch in unseren

Versuchen der Einfluß des Tetrachlorkohlenstoffs auf den Pyruvat- und Succinatabbau durch die Leber erst bei Substratbelastung signifikant in Erscheinung.

Mit der Methode von Kaplan u. Lipmann werden nicht nur Co-Enzym A-SH, sondern auch die vom Gewebe ausnutzbaren inaktiven Stufen erfaßt, die nach Untersuchungen von Leuschner im normalen Lebergewebe von Meerschweinchen mehr als das 3fache der aktiven Verbindungen betragen können. Während in der normalen Leber 0,15 μ mol Co-Enzym A/g Frischgewebe gefunden wurden, beträgt die Co-Enzym A-Menge der durch Tetrachlorkohlenstoff geschädigten Leber nur 0,052 μ mol. Im Verhältnis zur starken Abnahme des Co-Enzym A-Gehalts ist die Hemmung der Atmung auffällig gering. Denn nach Novelli u. Lipmann und Lynen u. Mitarb. steht der Co-Enzym A-Gehalt in Beziehung zur Atemgröße. So steigt bei Hefezellen mit zunehmender Co-Enzym A-Menge die Acetatoxydation an. Andererseits führt eine Steigerung der Atemgröße zur Zunahme der Co-Enzym A Konzentration. Wenn diese Beobachtungen auf die Verhältnisse in tierischem Gewebe übertragen werden dürfen, dann spricht die von uns beobachtete, im Verhältnis zu der erheblichen Abnahme des Co-Enzym A-Gehalts geringe Hemmung der Atmung für eine Entkopplung dieser Beziehung bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. Die Ursache für den Co-Enzym A-Mangel ist in einer Schädigung der das Co-Enzym aufbauenden Fermente, in einer Verminderung der für den Co-Enzym A-Aufbau notwendigen energieliefernden Verbindungen oder in einer unmittelbaren chemischen Inaktivierung des Co-Enzym A durch Tetrachlorkohlenstoff zu suchen.

Der Auf- und Abbau der Fettsäuren führt über das Co-Enzym A. Nur die durch Verbindung mit Co-Enzym A aktivierten Säuren kann die Zelle weiter abbauen. Im Fettsäurecyclus wird in vier Reaktionsschritten, die Co-Enzym A abhängig sind, die Fettsäurekette um je 2 Kohlenstoffatome verkürzt. Der Abbau führt letzten Endes zur aktivierten Essigsäure (Acetyl-Co-Enzym A), die dann über den Citronensäurecyclus endgültig oxydiert wird. Der Co-Enzym A-Gehalt im Gewebe ist somit für den Fettsäureumsatz ein empfindlicher Regelmechanismus. Bemerkenswert ist das gleichzeitige Auftreten von Co-Enzym A-Mangel und einer schweren Störung des Fettumsatzes in der Leber bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. Die Verfettung des Leberparenchyms könnte mit dem Co-Enzym A-Mangel in ursächlichem Zusammenhang stehen.

Die Aktivität der Aminoxydase und Novocainesterase der Leber wird durch Tetrachlorkohlenstoffschädigung signifikant herabgesetzt. Die Ursache kann in einem Mißverhältnis zwischen Fermentneubildung und -Abbau und in einer direkten Inaktivierung dieser Fermente durch Tetrachlorkohlenstoff liegen.

Zwischen Tetrachlorkohlenstoff und der Aktivität der Aminoxydase, Novocainesterase und des Co-Enzym A besteht folgende direkte Beziehung: Die Aktivität des Co-Enzym A und der genannten Fermente ist an das Vorhandensein freier

SH-Gruppen gebunden (Friedenwald u. Herrmann, Singer u. Barron, Lipmann u. Mitarb., Snell u. Mitarb.). Tetrachlorkohlenstoff kann nach den Befunden von Quastel und Michaelis u. Schubert durch chemische Reaktionen mit SH-Gruppen diese Fermente vermutlich irreversibel inaktivieren. Binet, Weller u. Goudard haben nachgewiesen, daß Tetrachlorkohlenstoffvergiftung den Gehalt der Leber an Glutathion, das zur Reaktivierung des Co-Enzym A, vielleicht auch der Aminoxydase und Novocainesterase benötigt wird, stark vermindert.

Die Ergebnisse der Atmungsversuche an Nierenschnitten sind in Tab. 2 zusammengestellt. Wenn Glucose als Oxydationssubstrat verwendet wird, liegt der Q_{O_2} der normalen Nierenschnitte um 100% über

Tabelle 2

	Q_{O_2} der Nierenschnitte					
	Glucose Mol/l			Pyruvat + Succinat Mol/l		
	0,005	0,015	0,025	0,01	0,025	0,045
normal	11,4	11,6	11,0	17,4	19,2	22,4
CCl_4-geschädigt	9,0	9,2	9,0	17,1	16,7	17,9
Abnahme in %	21	21	18	2	13	20
t.	2,5	2,3	2,7	0,5	1,0	2,75
P	0,02	0,02	0,02	0,6	0,3	0,02

dem des normalen Lebergewebes. Auch die Brenztraubensäure- und Bernsteinsäureoxydation durch Nierengewebe übertrifft die der Leber. Der Q_{O_2} des durch Tetrachlorkohlenstoff geschädigten Nierengewebes ist gegenüber dem normaler Nierenschnitte bei Verwendung von Glucose als Substrat signifikant gesenkt. Die Hemmung der Pyruvat- und Succinatoxydation durch Tetrachlorkohlenstoff tritt, wie bei den geschädigten Leberschnitten, erst unter Belastung mit höheren Substratkonzentrationen in Erscheinung.

Der Unterschied in der Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs auf die Glucoseatmung der Leber- und Nierenschnitte kann folgenden Grund haben. Leberschnitte verbrennen infolge des sehr geringen Hexokinasegehaltes dieses Organs auch in glucosehaltigem Nährmedium sehr wahrscheinlich nur gewebseigenes Glykogen. Zur Bildung von Glucose-6-Phosphat aus Glykogen wird in den Leberschnitten weder Hexokinase benötigt, noch energiereiches Phosphat verbraucht. Dagegen zwingt der minimale Glykogengehalt das Nierengewebe zur Oxydation der dem Nährmedium zugesetzten Glucose, die mit Hilfe der reichlich vorhandenen Nierenhexokinase unter Umwandlung von ATP in ADP in Glucose-6-Phosphat überführt wird. Diese Reaktion ist stark exergonisch. Eine Schadigung der Nierenhexokinase durch Tetrachlorkohlenstoff ist deshalb wahrscheinlich, weil Bailey u. Webb gezeigt haben, daß Gifte, die Sulfhydrylgruppen inaktivieren, die Hexokinase schädigen.

Zusammenfassung

Unsere Versuche haben ergeben, daß durch Tetrachlorkohlenstoff bevorzugt Enzyme und Co-Enzyme geschädigt werden, die durch freie Sulfhydrylgruppen wirken. Tetrachlorkohlenstoff in Dosen, die zu Leberverfettung und Nekrose führten, vermindert die Co-Enzym A-, Aminoxydase- und Novocainesteraseaktivität der Leber. Die Ruheatmung der Leber wird nicht beeinflußt, die der Nieren dagegen gehemmt. Erst bei Verwendung höherer Substratkonzentrationen tritt auch eine Hemmung der Pyruvat- und Succinatoxydation durch das Leber- und Nierengewebe in Erscheinung. Die Abnahme des Co-Enzym A-Gehalts der Leber auf $^1/_3$ der normalen Werte wird mit einer Störung im Fettsäureabbau und der durch Tetrachlorkohlenstoff hervorgerufenen Leberverfettung in Beziehung gebracht.

Literatur

Adams, D. H., and F. J. C. Roe: Brit. J. Canc. **7**, 509 (1953). — Bailey, K., and E. C. Webb: Biochemic. J. **42**, 60 (1948). — Binet, L., G. Weller et H. Boudard: C. r. Soc. Biol. (Paris) **124**, 1141 (1937). — Brown, L. M., and M. F. Harrison: Nature (Lond.) **168**, 83 (1951). — Bruns, F. H., u. J. Neuhauer: Biochem. Z. **326**, 242 (1955). — Chen, Tsi-Tsao: Tohoku J. Exper. Med. **38**, 193 (1940). — Christie, G. S., and J. D. Judah: Proc. Roy. Soc. Lond. **142**, 241 (1954). — Friedenwald, J. S., and H. Herrmann: J. of Biol. Chem. **146**, 411 (1942). — Frunder, H., u. W. Friedel: Hoppe-Seylers Z. **295**, 77 (1953). — Hove, E. L., and J. O. Hardin: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 858 (1951). — Kaplan, N. O., and F. Lipmann: J. of Biol. Chem. **174**, 37 (1948). — Leuschner, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmokol. **228**, 288 (1956). — Lipmann, F., N. O. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle and B. M. Guirard: J. of Biol. Chem. **186**, 235 (1950). — Lynen, F., E. Reichert u. L. Rueff: Liebigs Ann. **574**, 1 (1951). — Michaelis, L., and M. P. Schubert: J. of Biol. Chem. **106**, 331 (1934). — Novelli, G. D., and F. Lipmann: J. of Biol. Chem. **182**, 213 (1950). — Quastel, J. H.: Nature (Lond.) **131**, 206 (1933). — Richter, M. L.: J. of Pharmacol. **102**, 94 (1951). — Singer, J. P. and E. S. Barron: J. of Biol. Chem. **157**, 241 (1945). — Snell, E. E., G. M. Brown, V. J. Peters, J. A. Craig, E. L. Wittle, J. A. Moore, V. M. McGlohon and C. D. Bird: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 5349 (1950). — Wik, A. N., and D. R. Drury: Amer. J. Physiol. **167**, 359 (1951).

Prof. Dr. Fritz Heim, Erlangen, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 366—373 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn)

Über die Natur und Bildung von Rattenserumanaphylatoxin

Von
H. Giertz, F. Hahn und A. Lange

(Eingegangen am 16. Juli 1956)

In einer vorausgehenden Arbeit haben wir (Hahn u. Lange) darüber berichtet, daß sich das Rattenserumanaphylatoxin mit der Cohnschen Methode 10 in der Globulinfraktion I-II-III, nach Entfernung von II auch in I-III und schließlich nach weiterer Fraktionierung noch in III-0 nachweisen läßt. Die stufenweise Auftrennung des Serums war allerdings mit einem zunehmenden Wirkungsverlust verbunden. Ob dieser auf unscharfer Trennung anaphylatoxinhaltiger und -freier Fraktionen oder auf Denaturierungsvorgängen beruhte, blieb unentschieden.

Wenn die Fraktionen aus Normalserum isoliert und nachträglich mit Kontaktsubstanzen (Dextran) inkubiert wurden, so ließ sich die Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung nur bis zur Stufe I-III nachweisen. Die hieraus isolierten Fraktionen III-0, I-III-3 und III-1,2 waren für sich allein nicht zu aktivieren, sondern nur in Kombination miteinander. Es ließ sich aus gewissen Beobachtungen entnehmen, daß in der Fraktion I-III die Matrix des Anaphylatoxins und ein katalytischer Faktor vorhanden sind, ohne daß sich beide voneinander isoliert zur Darstellung bringen ließen.

Zur Klärung der noch ausstehenden Fragen wurden die folgenden Versuche durchgeführt, in denen wir uns methodisch im wesentlichen an die vorausgehende Arbeit hielten (Hahn u. Lange). Das Rattenserum und seine Fraktionen wurden mit Dextran (Macrodex) inkubiert und an Meerschweinchen auf Anaphylatoxinwirkung getestet. Anstelle der früher verwendeten gepufferten Kochsalzlösung diente jetzt Tyrode-Lösung zur Auflösung der Fraktionsniederschläge. Als wichtig erwies sich eine Modifikation bei der Extraktion und Wiederausfällung von III-0 in Abschnitt II der folgenden Ausführungen.

I. Fraktionierung anaphylatoxinhaltigen Serums

Nach der Zerlegung von Serum, das vorher mit Dextran inkubiert worden war, fanden wir jetzt in den Globulinfraktionen mehr Anaphylatoxin wieder als früher. Auf III-0 entfiel etwa die Hälfte der Gesamtaktivität des Serums (Tab. 1). Die andere Hälfte wurde zu einem

Tabelle 1. *Wirksamkeit anaphylatoxinhaltigen Rattenserums und seiner Fraktionen beim Meerschweinchen*
Rattenserum mit Dextran (50 mg/10 ml) 1 Std bei 37° C inkubiert. Kontrollserum ohne Dextran 1 Std bei 37° C inkubiert. III—0 mit 27,7 Vol-% Alkohol und 0,0035 Mol/l Zinkionen nach der Extraktion gefällt. Auflösung der einzelnen Fraktionen mit Tyrode im gleichen Volumen wie das Ausgangsserum

Fraktion	Dosis ml/100 g	Aus Anaphylatoxin-Serum				Aus Normalserum			
		Zahl der Serum-chargen	Zahl der Testungen	davon mit Schock	davon letal	Zahl der Serum-chargen	Zahl der Testungen	davon mit Schock	davon letal
Gesamtserum	0,25	15	32	29	10				
	0,5		23	22	18		4 ml/100 mg tödliche Dosis		
	1,0		1	1	1				
I-II-III	0,25	4	3	2	0	—	—	—	—
	0,5		20	20	6		—	—	—
	1,0		4	4	4		—	—	—
I-III	0,5	1	5	3	1	—	—	—	—
	1,0		3	3	3		—	—	—
III-0	0,5	11	12	9	2	7	—	—	—
	1,0		19	19	13(12)		2	0	0
	1,5		14	14	13(11)		—	—	—
	2,0		—	—	—		5	0	0
	3,0		—	—	—		3	0	0
I-III-1, 2, 3	0,25	11	1	0	0	6	—	—	—
	0,5		10	5	2		—	—	—
	1,0		16	14	8(7)		—	—	—
	1,5		9	8	2		—	—	—
	2,0		11	10	10(9)		4	0	0
	3,0		1	1	0		2	0	0

Tabelle 2. *Anaphylatoxingehalt von III-0 und I-III-1, 2, 3 nach einmaliger und zweimaliger Extraktion von III-0*
III-0 - Extrakte bei zweimaliger Extraktion vereinigt. Extrakte im Volumen des Ausgangsserums mit Tyrode gelöst. Testung am Meerschweinchen

Fraktion aus Anaphylatoxin	Dosis ml/100 g	Einmalige Extraktion von III-0			Zweimalige Extraktion von III-0		
		Anzahl der Einzeltestungen	davon mit Schock	davon letal	Anzahl der Einzeltestungen	davon mit Schock	davon letal
III-0	0,5	2	0	0	2	1	0
	1,0	8	7	5	9	8	3
	1,5	1	1	1	2	2	0
	2,0	1	1	1	1	1	0
I-III-1, 2, 3	0,5	2	0	0	—	—	—
	1,0	4	3	1	3	3	1
	1,5	4	3	1	4	1	1
	2,0	9	8	5	9	8	2

erheblichen Teil durch eine in I-III-1,2,3 (der anderen Komponente von I-III) aufgefundene Wirksamkeit gedeckt. Ein kleiner Rest, der noch fehlt, tritt als Wirkungsdefizit schon bei der Isolierung von I-II-III und I-III auf. Während also die Zerlegung von I-III in ihre beiden Komponenten praktisch ohne Wirkungsverlust möglich ist, möchten wir den Verlust bei der ersten Auftrennung des Serums heute weniger auf eine Inaktivierung von Anaphylatoxin als auf einen Übertritt in die Albuminfraktion IV-V-VI zurückführen, zumal nach Keltz u. Mehl dieser Fraktion bei der Ratte noch Globulin anhaftet.

Die bessere Ausbeute an Anaphylatoxin in den Globulinfraktionen bei unseren jetzigen Versuchen ist nur zum Teil auf die Verwendung von Tyrode anstelle von Kochsalzlösung als Lösungsmittel für die Fraktionen zurückzuführen. Der Anteil in I-III-1,2,3 war uns früher hauptsächlich deshalb entgangen, weil die wenigen damals geprüften Proben zu schwach waren und von „unspezifischen" Wirkungen überlagert waren. Das sind Schockreaktionen, die auch bei den Kontrollen, d. h. ohne Inkubation mit Dextran, auftreten können. Diese störten unsere jetzigen Versuche kaum. Sie

waren nur bei den später zu besprechenden Versuchen der Tab. 3 einigemal vorhanden. Da sie nur bei hohen Dosen (meist über 2 ml/100 g) auftreten, bereitet ihre Abgrenzung von den echten, d. h. durch Inkubation mit Dextran bedingten Schockwirkungen bei genügender Wirksamkeit des Anaphylatoxins ohnedies keine Schwierigkeit.

Der Lungenbefund wurde stets autoptisch kontrolliert. Das typische Bild der Anaphylatoxinwirkung ist eine reine Lungenblähung. Selten ist es von embolischen Prozessen oder Ödem überlagert, wie es bei den „unspezifischen" Reaktionen meistens der Fall ist. Auch Todesfälle ohne Lungenblähung kamen bei den Kontrollen wie auch bei den Anaphylatoxintieren vereinzelt vor. Sie sind in den Tabellen durch die Angabe zweier Letalitätszahlen in einzelnen Versuchsgruppen kenntlich gemacht. Die nicht eingeklammerte Zahl gibt die Gesamtletalität, die eingeklammerte Zahl die Fälle mit Lungenblähung wieder. Die Lungenblähung wurde namentlich bei protrahiert verlaufendem Anaphylatoxinschock vermißt. Im Regelfalle tritt der Tod in 5 min ein.

Es tauchte noch die Frage auf, ob der Anaphylatoxinanteil in I-III-1,2,3 auf ungenügender Trennung von III-0 und I-III-1,2,3 beruhe. Wir haben daher in einigen Versuchen nach der Extraktion von III-0 die Fraktion I-III-1,2,3 noch einmal mit der gleichen Menge des Extraktionsmittels ausgezogen und beide Extrakte vereinigt. Obwohl bei der zweiten Extraktion noch deutlich Eiweiß mit überging, blieb die Aktivität von III-0 unverändert (Tab. 2). Nur in I-III-1,2,3 nahm sie etwas ab, ohne aber zu verschwinden. Das Anaphylatoxin gehört also keiner einheitlichen Serumfraktion an, sondern besteht anscheinend aus zwei Quoten mit differentem physikochemischem Verhalten.

II. Wirkungsmechanismus der Anaphylatoxinbildung

In diesen Versuchen wurden die Fraktionen aus normalem Serum isoliert und nachträglich mit Dextran inkubiert. Auch jetzt war es wieder möglich, durch Inkubation von I-III eine Anaphylatoxinbildung zu erreichen. Die Wirksamkeit war fast die gleiche wie die von nativem Anaphylatoxinserum. Auch nach einmaliger Extraktion von III-0 lieferte das so gewonnene I-III-1,2,3 durch Inkubation mit Dextran noch ein Anaphylatoxin, allerdings von geringerer Stärke (Tab. 3). Die Verwendung von Tyrode statt Kochsalzlösung für die Auflösung von I-III-1,2,3 erwies sich hierbei von eindeutigem Vorteil. Da die stärkere Wirkung des mit I-III erhaltenen Anaphylatoxins auf eine verstärkende Wirkung von III-0 hindeutete, suchten wir diese durch Vereinigung von III-0 mit I-III-1,2,3 direkt nachzuweisen (Tab. 4). Dabei hatte aber III-0, wenn es in der von uns bisher geübten Weise mit Zink gefällt war, den gegenteiligen Effekt: es hemmte die Anaphylatoxinbildung durch I-III-1,2,3. Wir änderten daraufhin das Verfahren zur Fällung von III-0, indem wir die Fällung ohne Zink durch Einstellung des p_H mit einem Acetatpuffer ($0{,}8I/2$ p_H 4,0) auf 5,8—5,9 bei einer Alkoholkonzentration von 19 Vol-% durchführten. Das sind die Fällungsbedingungen, die auch bei der

Tabelle 3. *Inkubation einzelner Rattenserumfraktionen mit Dextran (50 mg/10 ml) 1 Std bei 37° C*
Wirkung bei Meerschweinchen. Kontrollproben ohne Dextran 1 Std bei 37° C. Einmalige und zweimalige Extraktion von III-0 aus I-III. Extrakte bei zweimaliger Extraktion miteinander vereinigt. III-0 ohne Zink bei p_H 5,8—5,9 und 19 Vol-% Alkohol nach der Extraktion gefällt. Auflösung der Fraktionen im gleichen Volumen wie das Ausgangsserum

Fraktion		Dosis ml/100 g	Mit Dextran inkubiert				Ohne Dextran inkubiert			
			Zahl der Serumchargen	Zahl der Testungen	davon mit Schock	davon letal	Zahl der Serumchargen	Zahl der Testungen	davon mit Schock	davon letal
I-III		0,25	5	10	8	2	2	—	—	—
		0,5		17	17	11		—	—	—
		1,0		7	7	6		—	—	—
		1,5		—	—	—		1	0	0
		2,0		—	—	—		2	0	0
III-0	einmalige Extraktion . .	3,0	4	4	1	0	—	—	—	—
	zweimalige Extraktion . .	3,0	5	7	1	0	2	2	0	0
I-III-1, 2, 3	nach einmaliger Extraktion von III-0	0,25	23	5	2	0	15	—	—	—
		0,5		33	23	13(12)		—	—	—
		1,0		40	34	19		1	0	0
		1,5		14	14	10		1	0	0
		2,0		17	16	12		15	3	1
		2,5		1	1	1		—	—	—
		3,0		1	1	1		10	6	3(2)
	nach zweimaliger Extraktion von III-0	1,0	5	2	0	0	2	—	—	—
		1,5		1	0	0		—	—	—
		2,0		4	0	0		—	—	—
		3,0		8	2	1(0)		2	0	0

Tabelle 3 (Fortsetzung)

| | | |

der Beweis für die Beteiligung zweier Faktoren an der Anaphylatoxinbildung definitiv erbracht.

Tabelle 4. *Wirkung von I-III-1,2,3 ohne und mit III-0, nach der Isolierung aus Normalserum mit Dextran inkubiert*
Einmalige Extraktion von III-0. Testung an Meerschweinchen. Fraktionen im Volumen des Ausgangsserums mit Tyrode gelöst

Fraktion mit Dextran inkubiert	Dosis ml/100 g	Anzahl der Einzeltestungen	davon mit Schock	davon letal
I-III-1,2,3	0,25	1	1	0
	0,5	6	5	3
	1,0	4	4	3
	1,5	3	3	3
I-III-1,2,3 + III-0 mit Zink gefällt	0,5	1	0	0
	1,0	4	3	0
	1,5	1	1	1
	2,0	1	0	0
I-III-1,2,3 + III-0 mit Alkohol gefällt	0,5	4	4	3
	1,0	2	2	2

Da schon seit Friedberger bekannt ist, daß durch Erwärmung des Serums auf 56—60° C seine Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung erlischt, haben wir noch geprüft, welcher der beiden Faktoren thermolabil ist. Es ergab sich, daß nur der in III-0 vorhandene Faktor durch einhalbstündige Erwärmung auf 56° C inaktiviert wird.

Besprechung der Ergebnisse

Nach unserer früheren Vermutung sollte das Substrat der Anaphylatoxinbildung in I-III-1,2,3 (speziell in III-1,2) enthalten sein, während von der Gesamtfraktion I-III (III-0 + III-1,2 + I-III-3) eine katalytische Funktion ausgeübt würde. Die jetzigen Versuche haben aber ergeben, daß mit der vollständigen Zerlegung von I-III im III-0 und I-III-1,2,3 auch die Trennung beider Faktoren erreicht werden kann. Die katalytische Wirkung wird daher nicht von der Gesamtfraktion I-III, sondern nur von einem ihrer beiden Teilstücke ausgeübt. Vermutlich ist es die Fraktion III-0; denn die Thermolabilität könnte der Ausdruck einer fermentartigen Wirkung sein, worauf nach Rothschild u. Rocha e Silva die Anaphylatoxinbildung beruhen soll. Die jetzt gelungene Isolierung der beiden Faktoren der Anaphylatoxinbildung eröffnet die Möglichkeit, der Natur des wahrscheinlich fermentativen Vorgangs der Anaphylatoxinbildung weiter nachzugehen.

Die Empfindlichkeit der Anaphylatoxinbildung gegenüber Zink könnte darauf hindeuten, daß das hierbei beteiligte Ferment SH-Gruppen enthält. Nach den neuesten Untersuchungen von Moussatché u. Danon

spielen auch bei der Anaphylatoxin*wirkung* auf das Lungengewebe SH-Gruppen eine Rolle. Jedoch wird das bereits gebildete Anaphylatoxin nicht durch Zink geschädigt, wie Vergleichsversuche mit und ohne Zinkfällung an III-0 aus anaphylatoxinhaltigem Serum ergaben.

Ob sich der in I-III-1,2,3 vorhandene Faktor durch weitere Fraktionierung noch schärfer einengen läßt, soll erneut geprüft werden. Die Vermutung, daß die Matrix des Anaphylatoxins in dieser Fraktion enthalten ist, würde sich mit unseren früheren Ausführungen decken. Ebenso müßte auch jetzt wieder angenommen werden, daß ein Übertritt von Anaphylatoxin aus I-III-1,2,3 in III-0 stattfindet, d. h. daß bei der Anaphylatoxinbildung die Matrix sich so verändert, daß das hieraus resultierende toxische Produkt bei der Extraktion von III-0 zum Teil miterfaßt wird.

Summary

1. In continuation of our previous investigations we have found that almost the whole activity of rat serum anaphylatoxin can be recovered by isolating the fractions III-0 and I-III-1,2,3 according to the method 10 of Cohn.

2. When III-0 is completely removed by double extraction of I-III, the potency to form anaphylatoxin is absent in the extracted fraction III-0 as well as in the remaining I-III-1,2,3. However, recombination of the two fractions restores this ability. The formation of anaphylatoxin depends obviously on the presence of two separable factors.

3. Zinc ions disturb the formation of anaphylatoxin. The factor of III-0 is, moreover, sensible to heating by 56° C.

Literatur

Cohn, E. J., and Mitarb.: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 465 (1950). — Friedberger, E.: Z. Immun.forsch., 1. Teil, **4**, 636 (1910). — Hahn, F., u. A. Lange: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 12 (1955). — Keltz, A., and J. W. Mehl: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 4004 (1954). — Moussatché, H., u. A. P. Danon: Naturwissenschaften **43**, 227 (1956). — Rothschild, A. M., and M. Rocha e Silva: Brit. J. Exper. Path. **35**, 507 (1954).

Prof. Dr. F. Hahn, Düsseldorf, Pharmakol. Institut d. Med. Akademie

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 374—380 (1956)

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft Basel

Pressorische Substanzen in den Nieren experimentell hypertonischer Ratten

Von
F. Gross und F. Sulser

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1956)

In einer früheren Mitteilung konnten wir zeigen, daß bei Ratten, bei denen durch Überdosierung von Cortexon und Kochsalz eine Hypertension hervorgerufen wird, der Gehalt pressorisch wirkender Substanzen in den Nieren vermindert ist (Gross u. Sulser [1]). Bessinger u. Wakerlin haben beschrieben, daß beim Hund mit renaler Hypertension der Reningehalt in derjenigen Niere, deren Arterie gedrosselt ist, unverändert, in der normal durchbluteten jedoch deutlich vermindert ist. Auch bei chronischer Überdosierung mit Cortexon nimmt beim Hund der Reningehalt der Nieren ab (Sevy u. Wakerlin) und Prado u. Mitarb. beschreiben, daß bei Ratten mit Cortexon-Hochdruck die Konzentration von Renin im Plasma nicht höher ist als bei Ratten mit normalem Blutdruck. Weiterhin haben Prado u. Valle zeigen können, daß die Nieren von Ratten mit verschieden ausgelöster Hypertension, wenn sie in den Kreislauf doppelseitig nephrectomierter Ratten eingeschaltet werden, den Blutdruck verschieden beeinflussen. Während Nieren mit gedrosselter Blutzufuhr am nephrectomierten Tier eine Blutdrucksteigerung auslösen, führen Nieren von Ratten mit Cortexon-Hochdruck nicht zu Blutdruckzunahme und verhalten sich wie normale Nieren.

Diese Befunde veranlaßten uns, die Zusammenhänge zwischen experimenteller Hypertension und Gehalt der Nieren an pressorisch wirkenden Substanzen erneut zu untersuchen, wobei wir uns zunächst auf den durch Überdosierung von Cortexon und Kochsalz auslösbaren Hochdruck an der Ratte beschränkten. Als geeignete Methode für die Bestimmung pressorischer Substanzen renalen Ursprungs erwies sich dabei die Testierung an der nierenlosen Ratte, bei der Renin oder frisch zubereiteter wäßriger Extrakt aus normalen Rattennieren zu einer gegenüber dem intakten Tier verstärkten und langanhaltenden Blutdrucksteigerung führen (Gross u. Sulser [3]). Weiterhin war abzuklären, ob der erhöhte Blutdruck als solcher verantwortlich für Änderungen im

Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen ist oder ob diese von der Blutdruckhöhe unabhängig sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Untersuchungen mit 1-Hydrazinophthalazin (Apresolin) durchgeführt, das in der Lage ist, die Entwicklung des Cortexon-Hochdruckes zu hemmen bzw. einen bereits bestehenden Hochdruck zu senken (Gross et al. [2]).

Methodik

a) Auslösung der Hypertension

Männliche Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 150 g wurden in Äthernarkose unilateral nephrectomiert und erhielten während 4 Wochen wöchentlich je eine subcutane Injektion von 50 mg Cortexon/kg in Form einer Mikrokristallsuspension (Kristallgröße unter 20 μ). Die Nahrung bestand aus Trockenfutter Lab-Blox „R" mit einem Kochsalzgehalt von etwa 0,7%, als Trinkflüssigkeit erhielten die Tiere 1%ige Kochsalzlösung ad libitum. Unter dieser Behandlung entwickelt sich innerhalb von 3—4 Wochen eine Hypertension mit durchschnittlichen Blutdruckwerten von 160—180 mm Hg (Gross et al. [2], Sulser).

Der Blutdruck wurde 1mal wöchentlich gemessen. Wir verwendeten die von Williams u. Mitarb. angegebene, von uns etwas modifizierte Methode, bei der der Blutdruck in leichter Äthernarkose plethysmographisch am Schwanz der Tiere bestimmt wird. Ausgedehnte Vergleichsuntersuchungen zeigten, daß leichte Äthernarkose die Blutdruckhöhe nicht wesentlich beeinflußt im Gegensatz zu tiefer Urethan-Narkose, unter der die bei plethysmographischer Messung in Äthernarkose hypertonischen Tiere bei blutiger Messung in der art. carotis meist keine erhöhten Blutdruckwerte mehr aufwiesen.

b) Bestimmung der pressorischen Substanzen renalen Ursprungs

280—320 g schwere männliche Ratten werden in Äthernarkose doppelseitig nephrectomiert. 20—24 Std nach Entfernung der Nieren werden die Tiere mit Urethan (1,4 g/kg s. c.) narkotisiert und der Blutdruck in der art. carotis communis mit einem Quecksilbermanometer besonders kleiner Dimension registriert.

Aus den auf Gehalt an pressorischen Wirkstoffen zu untersuchenden Nieren wird ein frischer wäßriger Extrakt durch Verreiben mit Quarzsand in physiologischer Kochsalzlösung und anschließender Zentrifugierung in der früher beschriebenen Weise hergestellt (Gross u. Sulser [3]). Als Testdosis werden jeweils 0,1 ml dieser Nierenextrakte in die vena jugularis injiziert. In allen Versuchen wurde die Reaktionsfähigkeit des nierenlosen Tieres auf blutdrucksteigernde Substanzen durch intravenöse Injektion von 2 γ/kg Adrenalin und 2 γ/kg nor-Adrenalin geprüft.

Folgende Versuchsgruppen wurden eingesetzt:

1. Eine Gruppe von 36 unilateral nephrectomierten Tieren, die Cortexon und Kochsalz in der unter a) angegebenen Weise erhielt.

2. Eine Gruppe von 36 unilateral nephrectomierten Tieren, die Cortexon und Kochsalz wie Gruppe 1 erhielt, jedoch zusätzlich mit 2 × 10 mg/kg Apresolin in Form einer 1%igen wäßrigen Lösung p. o. täglich behandelt wurde.

3. Eine Kontrollgruppe von 36 Tieren, die nach unilateraler Nephrectomie weder Cortexon noch Kochsalz erhielt. Als Trinkflüssigkeit stand Wasser ad libitum zur Verfügung.

Von jeder der drei Versuchsgruppen wurden wöchentlich 6 Tiere mit Äther getötet und die Nieren auf ihren Gehalt an pressorischen Wirkstoffen nach der unter

b) angegebenen Methode bestimmt. Die drucksteigernde Wirkung der Nierenextrakte wurde nach Intensität und Dauer bestimmt, wobei als Maß für das Wirkung-Zeit-Produkt das Integral der Blutdruckkurve planimetrisch ermittelt wurde (Druck-Zeit Fläche). Aus den pro Gruppe bestimmten Einzelwerten wurde jeweils der Mittelwert und der standard error nach der Formel

$$\varepsilon = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$$

berechnet.

Resultate

Versuchsgruppe 1. Unter Überdosierung von Cortexon und Kochsalz steigt der Blutdruck kontinuierlich bis zur 3. Woche an und nimmt in der folgenden Woche noch leicht zu bis auf einen Mittelwert von 181 $\pm$ 3 mm Hg (Abb. 1). Während Extrakt aus Nieren unbehandelter Ratten am

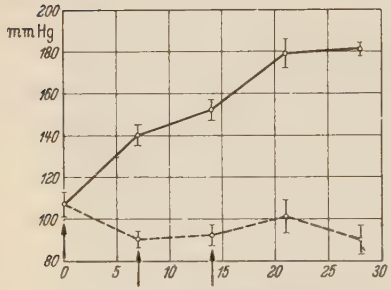


Abb. 1. Blutdruck (Mittelwerte) bei Überdosierung von Cortexon und Kochsalz (ausgezogene Linie) und bei gleichzeitiger Behandlung mit Apresolin (unterbrochene Linie). Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Injektion von je 50 mg/kg Cortexon an. Abszisse: Zeit in Tagen, Ordinate: Blutdruck in Millimeter Hg

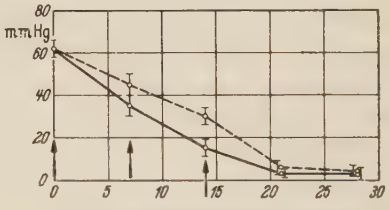


Abb. 2. Pressorische Wirkung der Nierenextrakte von den Tieren der in Abb. 1 dargestellten Versuchsgruppen an der nierenlosen Ratte. Ausgezogene Linie: Tiere mit Cortexon und Kochsalzüberdosierung. Unterbrochene Linie: Tiere mit zusätzlicher Apresolin-Behandlung. Abszisse: Zeit in Tagen, Ordinate: Blutdruck in Millimeter Hg

nierenlosen Tier zu langanhaltender Blutdrucksteigerung führt, nimmt die pressorische Wirkung der Nierenextrakte von hypertonischen Tieren ab. Bereits nach einer Woche ist eine deutliche Verminderung der pressorischen Aktivität nachweisbar und drei Wochen nach Beginn der Cortexon-Behandlung ist mit der angewendeten Testmethode praktisch kein pressorisches Prinzip mehr in den Nieren nachweisbar (Abb. 2). Am gleichen nierenlosen Tier, an dem Nierenextrakt von einer mit Cortexon und Kochsalz behandelten Ratte keine Blutdrucksteigerung hervorruft, führt ein aus normalen Rattennieren hergestellter Extrakt zu typischer langanhaltender pressorischer Wirkung (Abb. 3). Es geht daraus hervor, daß nicht Unterschiede in der Empfindlichkeit des Testtieres für die abgeschwächte bzw. fehlende Blutdrucksteigerung verantwortlich sein können.

Versuchsgruppe 2. Bei den mit Apresolin behandelten Tieren steigt der Blutdruck trotz gleicher Überdosierung von Cortexon und Kochsalz

wie in Versuchsgruppe 1 nicht an, sondern zeigt sogar einen leichten Abfall gegenüber dem Ausgangswert (Abb. 1). Die Nieren der Tiere dieser Versuchsgruppe weisen jedoch eine gleiche Verminderung an pressorischen Wirkstoffen auf wie die Nieren der hypertonischen Tiere (Abb. 2). Die etwas geringere Abnahme bei der Testierung nach 2 Wochen ist nicht signifikant und nach 4 Wochen ist kein drucksteigernder Effekt mehr nachweisbar. Es geht daraus hervor, daß die Abnahme der Nieren an pressorischen Substanzen nicht in direkter Abhängigkeit von der Blutdruckhöhe steht und daß Überdosierung von Cortexon und Kochsalz auch dann ein Verschwinden pressorisch wirksamer Substanzen in der Niere zur Folge hat, wenn die unter dieser Behandlung auftretende Hypertonie verhindert wird.

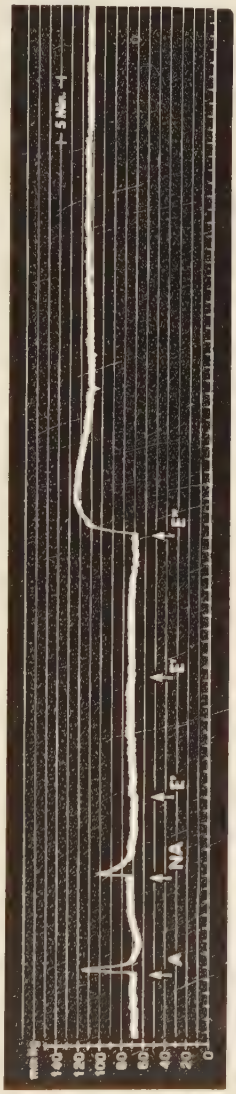


Abb. 3. Blutdruck, nierenlose Ratte (20 Std nach doppelseitiger Nephrectomie) Urethan-Narkose. Keine Wirkung des Extraktes aus einer Niere nach Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz (*E'*), dagegen langanhaltender Druckanstieg nach Injektion eines Extraktes aus normaler Niere (*E''*). A: 2 γ/kg Adrenalin. NA: 2 γ/kg Nor-Adrenalin

Versuchsgruppe 3. Die bei der Kontrollgruppe erhobenen Befunde zeigen, daß unilaterale Nephrectomie ohne Einfluß auf den Blutdruck und auf den Gehalt an pressorischen Wirkstoffen in der verbleibenden Niere ist (Abb. 4). Die pressorische Wirkung der Extrakte aus der nach unilateraler Nephrectomie verbleibenden Niere entspricht derjenigen von Nieren normaler Tiere. Die nach einseitiger Nierenentfernung auftretende kompensatorische Hypertrophie ist somit ohne Bedeutung für den Gehalt der Niere an blutdrucksteigernden Substanzen.

In ergänzenden Versuchen ließ sich zeigen, daß bei der durch Überdosierung von Methylandrostendiol und Kochsalz auslösbaren Hypertension, bei der allerdings im allgemeinen keine gleichhohen Blutdruckwerte erreicht werden wie bei Überdosierung von Cortexon, die pressorischen Substanzen in der Niere in gleicher Weise abnehmen wie beim Cortexon-Hochdruck. Die durch Überdosierung der beiden Steroide und Kochsalz ausgelösten Nierenveränderungen sind somit ähnlich, was sich auch aus den pathologisch anatomisch nachweisbaren Schädigungen ergibt (Salgado u. Selye, Skelton, Loustalot [1]).

Besprechung der Ergebnisse

Die an der Ratte durch Überdosierung von Cortexon und Kochsalz ausgelöste Hypertonie geht mit einer Verminderung bzw. einem Verschwinden der aus der Niere extrahierbaren pressorisch wirkenden Substanzen einher. Dabei ist, wie aus den Versuchen mit Apresolin hervorgeht, die Höhe des Blutdrucks allein nicht maßgebend für das Verschwinden der pressorischen Substanzen. Es ist vielmehr anzunehmen, daß Überdosierung von Cortexon und Kochsalz zu Veränderungen führt, die sowohl eine Blutdrucksteigerung als auch eine Abnahme der pressorischen Wirkstoffe in der Niere zur Folge haben. Hohe Dosen von Cortexon und Kochsalz rufen in den Nieren, besonders in den Glomerula, typische Läsionen hervor (Selye [1], Selye [2]). Außerdem sind jedoch auch in anderen Gefäßgebieten (Mesenterium, Herz) Veränderungen nachweisbar. Wird durch gleichzeitige Apresolin-Behandlung ein Anstieg des Blutdruckes verhindert, so sind sowohl die Schädigungen in den Glomerula als auch in anderen Gefäßgebieten im allgemeinen weniger deutlich, ohne jedoch ganz unterdrückt zu sein (Loustalot [2]). Die Tatsache, daß die Niere unter Cortexon- und Kochsalz-Überdosierung trotz Apresolin-Behandlung an pressorischen Substanzen verarmt, zeigt, daß nicht alle in der Niere ausgelösten Veränderungen durch Apresolin beeinflußt werden. Das vorwiegend an den Arterien und Arteriolen angreifende Apresolin wirkt einer Zunahme des peripheren Widerstandes entgegen und verhindert damit die Manifestierung des Blutdruckanstieges, ohne die ihm zugrunde liegenden Ursachen auszuschalten. Damit steht die Beobachtung in Übereinstimmung, daß nach Absetzen der Apresolin-Behandlung der Blutdruck auf hypertone Werte ansteigen kann (Gross et al. [2]).

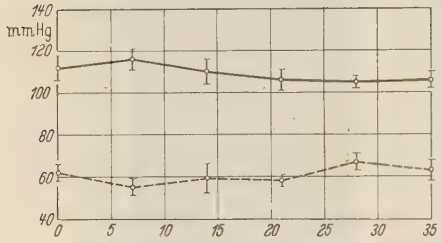


Abb. 4. Blutdruckverlauf (ausgezogene Linie) und pressorische Wirkung der Nierenextrakte (unterbrochene Linie) bei der unilateral nephrectomierten Kontrollgruppe. Abszisse: Zeit in Tagen. Ordinate: Blutdruck in Millimeter Hg

Obwohl die Versuche mit Apresolin gegen eine einfache Abhängigkeit des Gehaltes der Nieren an pressorischen Substanzen von der Höhe des Blutdruckes sprechen, sind doch bestimmte Beziehungen zwischen diesen Faktoren nicht auszuschließen. Die einleitend erwähnten Befunde, daß bei Hunden mit renaler Hypertension der Reningehalt in der gedrosselten Niere unverändert, in der normal durchbluteten dagegen vermindert ist (Bessinger u. Wakerlin), werden durch eigene, noch nicht abgeschlossene Untersuchungen bestätigt und ergänzt. Es ließ sich zeigen, daß bei Ratten nach Drosselung einer Nierenarterie der Gehalt pressorischer Substanzen in der zugehörigen Niere nicht vermindert

ist, dagegen in der nichtgedrosselten Niere bis auf minimale Werte abnimmt.

Entsprechende Befunde ergaben sich bei der sogenannten „endocrine kidney" (Selye [3], Selye u. Stone), bei der die unterhalb der Aortendrossel gelegene Niere pressorische Stoffe enthielt, während sie sich in der Niere oberhalb der Drossel nicht mehr nachweisen ließen (Sulser u. Gross). Auf Grund unserer Befunde kann allerdings nicht angegeben werden, ob das Verschwinden pressorischer Substanzen in der nicht gedrosselten Niere auf die Zunahme des Blutdruckes zurückzuführen ist.

Ob die vor allem im Anschluß an die Arbeiten von Goldblatt vertretene Auffassung über die maßgebende Bedeutung von Renin bzw. dem dadurch aus Hypertensinogen freigesetzten Hypertensin für das Zustandekommen der renalen Hypertension in dieser Form zutrifft, ist fraglich. Auf Grund unserer Befunde nehmen wir an, daß die zu Hypertension führenden Schädigungen (Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz, Verminderung der Nierendurchblutung) entweder die Produktion von pressorischen Substanzen, die sich normalerweise in den Nieren finden, beeinträchtigten oder daß infolge vermehrten Bedarfes eine Verarmung an diesen Stoffen auftritt.

Summary

1. In rats suffering from hypertension due to overdosing with cortexone and sodium chloride, the level of pressor substances in the kidneys (renin?) drops to a minimum within 3—4 weeks.

2. Although Apresoline suppresses the hypertension, it is unable to counteract this reduction in the level of pressor substances.

3. Unilateral nephrectomy has no effect on the level of pressor substances in the remaining kidney.

4. It is presumed that substances normally formed in the kidney having hypertensive activity and possibly other properties, are as a consequence of sodium overloading either no longer produced or depleted.

Literatur

Bessinger, H. E., and G. E. Wakerlin: Relation of the adrenal glands to the renin concentration of the canine kidney. Amer. J. Physiol. **155**, 426 (1948). — Goldblatt, H., J. Lynch, R. F. Hanzal and W. W. Summerville: Studies in experimental hypertension: Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischaemia. J. of Exper. Med. **59**, 347 (1934). Goldblatt, H.: The renal origin of hypertension. Physiologic. Rev. **27**, 120 (1947). — Gross, F., u. F. Sulser [1]: Verstärkung und Normalisierung der blutdrucksteigernden Wirkung von Renin an der Ratte. Helvet. physiol. Acta **12**, C75 (1954). — Gross, F., B. Noelpp, F. Sulser, R. Döbelin u. H. Kündig [2]: Vergleichende Untersuchungen über die medikamentöse Beeinflussung verschiedener Formen von experimenteller Hypertension. Klin. Wschr. **1955**, 372. — Gross, F., u. F. Sulser [3]: Wirkungsverstörkung von Renin und Nierenextrakt an der nierenlosen Ratte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 338 (1956). Loustalot, P. [1]:

Morphologischer Vergleich experimenteller Läsionen junger Ratten mit analogen spontanen Veränderungen alter Tiere. Schweiz. med. Wschr. **1955**, 631. — Loustalot, P. [2]: Persönliche Mitteilung. — Prado, J. L., and J. R. Valle: Grafting of kidneys from rats with DCA-hypertension into normotensive receptors. Acta Physiol. Lat.-Am. **2**, 56 (1952). — Prado, J. L., Z. P. Picarelli, R. Kupper, E. S. Prado and J. R. Valle: Renin content of systemic blood of rats with desoxycorticosterone and metacorticoid hypertension. Circulation (New York) **2**, 359 (1954). — Salgado, E., and H. Selye: The production of hypertension, nephrosclerosis and cardiac lesions by methylandrostenediol treatment in the rat. Endocrinology (Springfield, Ill.) **55**, 550 (1954). — Selye, H. [1]: Production of nephrosclerosis by overdosage with desoxycorticosterone acetate. Canad. Med. Assoc. J. **47**, 515 (1942). — Selye, H. [2]: Role of sodium chloride in production of nephrosclerosis by steroids. Pric. Soc. Exper. Biol. a. Med. **52**, 190 (1943). — Selye, H. [3]: Transformation of kidney into an exclusively endocrine organ. Nature (Lond.) **158**, 131 (1946). — Selye, H., and H. Stone: Pathogenesis of the cardiovascular and renal changes which usually accompany malignant hypertension. J. of Urol. **56**, 399 (1946). — Sevy, R. W., and G. E. Wakerlin: Endocrine factors in experimental renal hypertension. Amer. J. Physiol. **172**, 129 (1953). — Skelton, F. R.: The production of hypertension, nephrosclerosis and cardiac lesions by methylandrostenediol treatment in the rat. Endocrinology (Springfield, Ill.) **53**, 452 (1953). — Sulser, F.: Auslösung und Beeinflussung verschiedener Formen von endokriner Hypertension an der Ratte. Inaug. Diss. Basel 1955. — Sulser, F., u. F. Gross: Pressorische Substanzen in den Nieren von Ratten mit sogenannten „Endocrine Kidney" nach Selye. Helvet. physiol. Acta im Druck. — Williams, J. R., A. Grollman and T. R. Harrison: A simple method for determining the systolic blood pressure of the unanesthetized rat. J. Clin. Invest. **18**, 373 (1939).

Dr. F. Gross, Wissenschaftl. Laboratorien d. Ciba AG., Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 381—388 (1956)

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft Basel

Die Bedeutung von Kochsalz für den Cortexon-Hochdruck der Ratte und den Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen

Von

F. Gross, P. Loustalot und F. Sulser

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1956)

In der vorhergehenden Mitteilung wurde beschrieben, daß Überdosierung von Cortexon und Kochsalz an der Ratte nicht nur zur Hypertonie, sondern gleichzeitig zu einer Abnahme des Gehaltes an pressorischen Substanzen (in der Hauptsache wohl Renin) in der Niere führt. Durch das blutdrucksenkend wirkende 1-Hydrazinophthalazin (Apresolin) läßt sich zwar der Blutdruckanstieg verhindern, nicht dagegen die Verminderung der pressorischen Wirkstoffe (Gross u. Sulser). Außer der Blutdrucksteigerung treten somit noch weitere Veränderungen auf, von denen nicht anzugeben ist, ob sie in direktem Zusammenhang mit der Hypertonie bzw. den dafür verantwortlichen Mechanismen stehen. Um weitere Einblicke in diese Verhältnisse zu gewinnen, führten wir vergleichende Versuche mit dem Ziel durch, die Bedeutung von Cortexon und von Kochsalz für die Entwicklung des Hochdruckes und für die Abnahme des Gehaltes der Nieren an pressorisch wirkenden Substanzen abzuklären. Selye hat bereits darauf hingewiesen, daß die nach Überdosierung von Cortexon auftretenden pathologischen Veränderungen, darunter auch die Hypertonie, nur bei gleichzeitiger Gabe genügender Mengen von Kochsalz in typischer Weise auftreten und kürzlich hat Braun-Menendez wieder die Bedeutung des Natriumfaktors für die Entwicklung von Nierenläsionen und Hypertension betont. Trotzdem wird in der Literatur bei Erwähnung der „toxischen" Effekte von Cortexon häufig nicht genügend berücksichtigt, daß für deren Manifestierung die gleichzeitige Überdosierung von Kochsalz bzw. von Natrium erforderlich ist.

Außer der Frage nach der Bedeutung von Cortexon und von Kochsalz für die Blutdrucksteigerung und den Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen war abzuklären, ob das Fehlen pressorischer Substanzen in Nierenextrakten einen reversiblen Befund darstellt oder ob diese Stoffe unter den gewählten Versuchsbedingungen definitiv aus den Nieren verschwinden.

Methode

Die Auslösung der Hypertension durch Cortexon und Kochsalz und die Testierung der Nierenextrakte auf Gehalt an pressorischen Substanzen erfolgten in gleicher Weise wie in der vorhergehenden Mitteilung angegeben (Gross u. Sulser). Wöchentlich einmal wurde der Blutdruck in leichter Äthernarkose plethysmographisch am Schwanz der Tiere bestimmt. Zusätzlich wurde jeweils eine Hälfte von Niere und Herz in Formol und in Helly-Lösung fixiert und histologisch untersucht. Von jeder Gruppe wurden wöchentlich 6 Tiere mit Äther getötet und ausgewertet.

Als Nahrung erhielten die Tiere entweder Trockenfutter Lab-Blox „R" (Allied Mills, Chicago) mit einem Kochsalzgehalt von etwa 0,7% oder ein kochsalzarmes Futter, das im wesentlichen aus Salat, Rüben, Kartoffeln und Getreidekörnern bestand. Der Kochsalzgehalt dieser Mischung betrug etwa 0,2%. Als Trinkflüssigkeit fand entweder 1%ige, ausnahmsweise 1,5%ige Kochsalzlösung oder Leitungswasser Verwendung.

Folgende Versuchsgruppen wurden eingesetzt:

1. Gruppe. 50 einseitig nephrectomierte Tiere erhielten wöchentlich während 4 Wochen je eine subcutane Injektion von 50 mg/kg Cortexon. Als Nahrung wurde Lab-Blox „R" Trockenfutter und 1%ige NaCl-Lösung gegeben. Nach 4 Wochen wurde die Nahrung auf kochsalzarmes Futter umgestellt und die 1%ige NaCl-Lösung durch Wasser ersetzt.

2. Gruppe. 50 einseitig nephrectomierte Tiere erhielten während 4 Wochen je einmal wöchentlich 50 mg/kg Cortexon subcutan. Im Gegensatz zu Gruppe 1 erhielten diese Tiere in der ersten Hälfte des Versuches, d. h. gleichzeitig mit der Cortexon-Behandlung kochsalzarmes Futter und Wasser als Trinkflüssigkeit, während in der zweiten Versuchshälfte von der 5. Woche an Trockenfutter und 1%ige Kochsalzlösung gegeben wurden.

3. Gruppe. 30 unilateral nephrectomierte Tiere erhielten Lab-Blox „R" Trockenfutter und eine 1,5%ige Kochsalzlösung als Trinkflüssigkeit.

Resultate

In *Versuchsgruppe 1* steigt der Blutdruck innerhalb von drei Wochen auf einen Durchschnittswert von 180 ± 3 mm Hg an und damit parallel geht die früher beschriebene Abnahme der pressorischen Aktivität in den Extrakten aus Nieren dieser Tiere. Nach Umsetzen der Trinkflüssigkeit von 1%iger Kochsalzlösung auf Wasser und zusätzlicher Verminderung des Kochsalzgehaltes in der Nahrung fällt der Blutdruck innerhalb von 3—4 Wochen auf normale Werte ab (106 ± 9 mm Hg). Gleichzeitig nimmt der Gehalt der Nierenextrakte an pressorischen Substanzen wieder zu und erreicht nach 4 Wochen annähernd den gleichen Wert wie vor der Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz (Abb. 1).

Die histologischen Veränderungen entsprechen nach einer Versuchsdauer von 3—4 Wochen den bekannten Schädigungen nach Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz. In den Nieren zeigen die Glomerula leichte bis schwerste Veränderungen der Gefäßschlingen, die bis zu hyaliner Degeneration gehen können, und eine Verdickung des Mesangiums. Die Wand der Coronargefäße ist häufig verdickt, die

Grundsubstanz homogenisiert; im Herzmuskel finden sich perivasculäre Granulombildungen.

Bei den nach 6—7 Wochen getöteten Tieren waren die Veränderungen qualitativ ähnlich, jedoch im allgemeinen quantitativ schwächer. Bei keinem der Tiere waren schwerste Läsionen nachweisbar, wie sie nach 3—4 Wochen beobachtet wurden.

Es war nicht möglich, mit Hilfe der angewendeten histologischen Färbemethoden (Hämalaun-Eosin, PAS, Oil red 0) Unterschiede zwischen den Nieren mit und ohne pressorische Wirkung nachzuweisen,

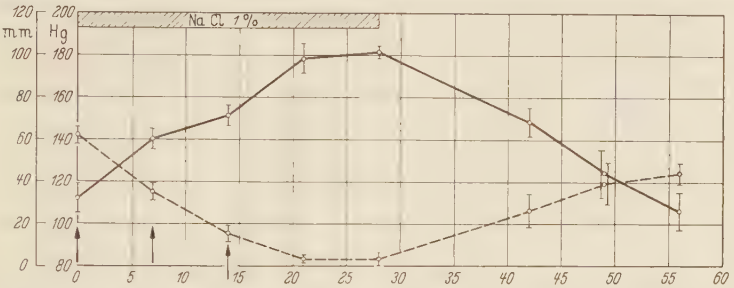


Abb. 1. Blutdruckverlauf (ausgezogene Linie) und pressorische Wirkung der Nierenextrakte (unterbrochene Linie) bei der ersten Versuchsgruppe. Nach Reduktion des Kochsalzgehaltes in Nahrung und Trinkflüssigkeit (28. Tag) fällt der Blutdruck auf normale Werte ab, und der Gehalt der Nierenextrakte an pressorischen Substanzen nimmt wieder zu. Abszisse: Zeit in Tagen. Ordinate: Linke Skala: Pressorische Wirkung der Nierenextrakte in Millimeter Hg; Rechte Skala: Blutdruck in Millimeter Hg. Pfeile: Je 50 mg/kg Cortexon-acetat s. c.

jedoch schließt dies nicht aus, daß sich mit spezifischeren Untersuchungsmethoden auch morphologische Äquivalente zu den funktionell erfaßbaren Veränderungen erkennen lassen.

In *Versuchsgruppe 2* steigt bei gleichen Dosen von Cortexon, jedoch geringem Kochsalzgehalt der Nahrung und Wasser als Trinkflüssigkeit, der Blutdruck nicht an und der Gehalt der Nierenextrakte an pressorischen Substanzen verändert sich nicht. Erst nach Zugabe von Kochsalz entwickelt sich eine Hypertonie und gleichzeitig damit nimmt die pressorische Aktivität der Nierenextrakte ab (Abb. 2). Obwohl die letzte Injektion von Cortexon eine Woche vor Umstellung der Nahrung auf erhöhten Kochsalzgehalt gegeben wurde, genügen die noch nicht resorbierten Mengen von Cortexon, um bei Zufuhr von Kochsalz eine Hypertonie und gleichzeitig damit eine Verminderung der pressorischen Nierenwirkstoffe hervorzurufen. Histologisch fanden sich bei keinem der innerhalb der ersten 4 Wochen getöteten Tiere typische Läsionen in Niere oder Herz. Es geht somit auch daraus hervor, daß Cortexon allein, selbst in dieser hohen Dosis, während einer mehrwöchigen Versuchsdauer keine pathologischen Veränderungen dieser Organe hervorruft. Nach Umsetzen auf kochsalzreiche Ernährung traten

die typischen Gefäßveränderungen in Niere und Herz auf. Häufigkeit und Intensität der Läsionen nehmen mit der Dauer der Kochsalzgabe zu.

Diese Versuche zeigen die entscheidende Bedeutung des Kochsalzfaktors bzw. von Natrium sowohl für die Blutdrucksteigerung als auch für den Verlust der Nieren an pressorischen Wirkstoffen.

Noch deutlicher kommt dies bei der *Versuchsgruppe 3* zum Ausdruck, die kein Cortexon erhalten hat, sondern lediglich vermehrt Kochsalz in der Nahrung, und zwar in Form einer 1,5%igen Kochsalzlösung als

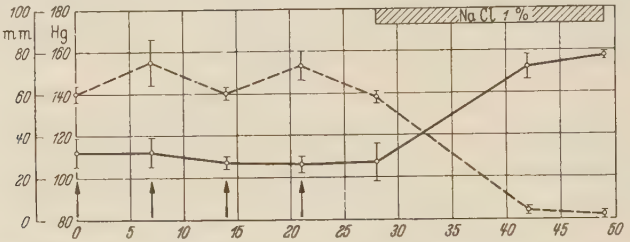


Abb. 2. Blutdruckverlauf (ausgezogene Linie) und pressorische Wirkung der Nierenextrakte (unterbrochene Linie) bei der zweiten Versuchsgruppe. Trotz gleicher Dosen von Cortexon entwickelt sich bei kochsalzarmer Ernährung keine Hypertension und keine Abnahme im Gehalt an pressorischen Nierenstoffen. Nach Zugabe von NaCl (28. Tag) steigt der Blutdruck an, und die pressorische Aktivität der Nierenextrakte nimmt ab. Übrige Bezeichnungen wie in Abb. 1

Trinkflüssigkeit. Der Blutdruck steigt auch unter diesen Versuchsbedingungen an, allerdings weniger stark und regelmäßig als bei gleichzeitiger Cortexon-Gabe und die Extrakte der Nieren dieser Tiere weisen eine verminderte pressorische Aktivität auf (Abb. 3). Alleinige Überdosierung von Kochsalz vermag somit zwar quantitativ keine gleich intensiven, jedoch qualitativ ähnliche Veränderungen hervorzurufen wie Kochsalz und Cortexon. Verschiedene Autoren haben nachgewiesen, daß Überdosierung von Kochsalz allein an der Ratte zu Hypertonie führen kann, wobei die Konzentration der Kochsalzlösung größer und die Versuchsdauer im allgemeinen länger war als bei unseren Versuchen (Auerbach et al., Meneely et al., Sapirstein et al., Toussaint et al., Zollinger et al.). Wird die Überdosierung von Kochsalz während mehrerer Monate fortgesetzt, so steigt der Blutdruck stärker an als in unseren Versuchen und es ist anzunehmen, daß unter diesen Bedingungen die pressorische Wirkung der Nierenextrakte ebenso stark zurückgeht wie bei gleichzeitiger Anwendung von Cortexon.

In Versuchen, in denen die Tiere eine 1%ige Kochsalzlösung erhielten, war bei einer Dauer von 8 Wochen kein signifikanter Blutdruckanstieg festzustellen und der Gehalt der Nieren an pressorischen Substanzen war nicht vermindert. Möglicherweise kann jedoch die längere Verabreichung einer 1%igen Kochsalzlösung zu Veränderungen führen, wie sie sich mit

höher konzentrierter Lösung bereits innerhalb einer kürzeren Zeitspanne erzielen lassen.

Die morphologischen Veränderungen entsprechen bei Zufuhr von Kochsalz qualitativ denjenigen bei Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz, jedoch fanden sich innerhalb der Versuchsdauer im allgemeinen nur leichtere Schädigungen an den Gefäßen in Nieren und Herz.

Besprechung

Für die Entwicklung eines Cortexon-Hochdruckes stellt die Anwesenheit genügender Mengen von Kochsalz eine Voraussetzung dar. Während sich auch mit hohen Cortexon-Dosen kein Hochdruck auslösen läßt, sind genügende Mengen von Kochsalz in der Lage, eine Hypertension hervorzurufen. Ebenso liegen die Verhältnisse für die Beeinflussung der pressorischen Wirkstoffe in der Niere, die unter Cortexon allein im Gegensatz zu Kochsalz nicht abnehmen. Der naheliegenden Annahme, daß der Gehalt der Niere an pressorischen Substanzen umgekehrt proportional der Höhe des Blutdruckes ist, steht der Befund gegenüber, daß durch geeignete Maßnahmen, z. B. durch Behandlung mit Apresolin, der Blutdruck zu normalisieren ist, während die Abnahme pressorischer Substanzen dadurch nicht beeinflußt wird. Da aber unter Apresolin die Kochsalzaufnahme nicht vermindert, sondern die tägliche Trinkmenge (1%ige Kochsalzlösung) sogar etwas größer ist als bei nicht behandelten Tieren, ist es verständlich, daß trotz ausbleibender Blutdrucksteigerung die Nierenextrakte keine pressorische Aktivität aufweisen. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen stellt somit die Überdosierung von Kochsalz unabhängig von der Blutdruckhöhe eine Voraussetzung für die Verminderung pressorischer Stoffe in der Niere dar. Es stellt sich weiterhin die Frage, ob die hauptsächliche Wirkung der Kombination von Cortexon und Kochsalz in einer Natrium- und Chlorretention besteht oder ob Cortexon außerdem noch weitere Veränderungen hervorruft. Die histologischen Befunde geben keinen Anhalt in dieser Richtung, jedoch kann Cortexon-Überdosierung zu einer Verschiebung der extra- und intrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentration führen mit Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration, während dies durch Überdosierung von Kochsalz nicht zu erreichen ist. In Versuchen mit Aldosteron und Kochsalz ließen sich mit Aldosteron in Dosen, die in bezug

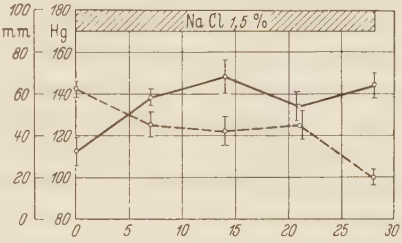


Abb. 3. Blutdruckverlauf (ausgezogene Linie) und pressorische Wirkung der Nierenextrakte (unterbrochene Linie) bei der dritten Versuchsgruppe. Auch 1,5%ige NaCl-Lösung bewirkt eine Steigerung des Blutdruckes und parallel dazu eine Abnahme der pressorischen Aktivität der Nierenextrakte. Bezeichnungen wie in Abb. 1

auf natriumretinierende Wirkung denen von Cortexon äquivalent sind, keine Hypertonie und keine Gefäßläsionen hervorrufen (Gross, Loustalot u. Meier), so daß möglicherweise dem Cortexon noch Wirkungen zukommen, die das stärker natriumretinierend wirkende Aldosteron in einem bestimmten Dosenbereich nicht besitzt. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß höhere Dosen von Aldosteron oder längere Versuchsdauer entsprechende Veränderungen wie Cortexon herbeiführen können.

Als weiterer Befund verdient die Reversibilität der Blutdrucksteigerung und der Verminderung an pressorischen Wirkstoffen festgehalten zu werden. Histologisch war allerdings kein sicherer Beweis für die Rückbildung von Gefäßveränderungen zu erbringen, sondern es fiel lediglich auf, daß die nach Umsetzen von kochsalzreicher auf kochsalzarme Ernährung untersuchten Tiere weniger schwere Läsionen aufwiesen als die während Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz sezierten Tiere. Es ist nicht auszuschließen, daß länger dauernde Einwirkung von Cortexon und Kochsalz irreversible Schädigungen hervorruft. Die von Green, Friedman und anderen beschriebene „sustained hypertension" nach Überdosierung mit Cortexon und Kochsalz spricht in diesem Sinne, da bei diesen Tieren Entzug von Kochsalz die Hypertension nicht beeinflußte, dagegen die Sterblichkeit der Tiere verminderte (Green et al.). Es ist somit anzunehmen, daß über längere Zeit fortgesetzte Überdosierung von Cortexon und Kochsalz Veränderungen zur Folge hat, die auch nach Wegfall der auslösenden Noxen nicht mehr rückbildungsfähig sind.

Die verminderte oder fehlende pressorische Wirkung von Nierenextrakten kann entweder durch eingeschränkte Produktion oder durch einen Verlust des in bestimmten Zellen gespeicherten Materials erklärt werden, während eine gesteigerte oder beschleunigte Inaktivierung weniger in Betracht kommen dürfte. Hartroft hat beschrieben, daß sowohl Überdosierung von Kochsalz als auch von Cortexon und Kochsalz zu einer Verminderung oder zu Verlust von normalerweise mit bestimmten Methoden nachweisbaren Granula in den juxtaglomerulären Zellen des Vas afferens führt, während diese Zellen bei kochsalzarmer Diät eher eine vermehrte Granulation aufweisen. Es liegt nahe anzunehmen, daß zwischen den Befunden von Hartroft und unseren eigenen Zusammenhänge bestehen, wenn auch der Beweis noch nicht erbracht ist, daß die Granula das morphologische Substrat der von uns nachgewiesenen pressorischen Substanzen darstellen. Goldblatt nimmt an, daß Renin durch Nierengewebe inaktiviert werden kann, und zwar durch reversible Überführung in eine enzymatisch inaktive Form. Wird ein derartiger Mechanismus zur Erklärung für das Fehlen einer pressorischen Wirkung herangezogen, so wäre eine Zunahme von inaktivierendem

Material oder eine irreversible Umwandlung in eine enzymatisch und damit pressorisch inaktive Form anzunehmen.

Ob die mit unserer Methode erfaßte pressorische Wirkung von Nierenextrakten im wesentlichen auf Renin zurückzuführen ist, ist auf Grund der vorliegenden Befunde nicht zu entscheiden, jedoch spricht die gekreuzte tachyphylaktische Reaktion zwischen dem verwendeten Schweinerenin und Extrakt aus normalen Rattennieren dafür, daß Renin maßgeblich am Zustandekommen der pressorischen Wirkung beteiligt ist. Die pressorische Aktivität stellt nicht die einzige Wirkung reninhaltiger Nierenextrakte dar. Frühere Untersucher (Croxatto et al., Hughes-Jones et al., Pickering et al., Sellers et al.) haben unter bestimmten Versuchsbedingungen eine diuretische und natriuretische Wirkung von Renin nachgewiesen, während Hypertensin diesen Effekt nicht besitzt (Croxatto [1]). Es ist daher anzunehmen, daß Renin oder andere aus den Nieren extrahierbare Substanzen nicht nur blutdrucksteigernd wirken, sondern daß ihnen unter physiologischen Bedingungen noch andere, für die Funktion der Niere wichtige Aufgaben zukommen.

Wir danken Herrn R. Döbelin für seine sorgfältige Hilfe bei der technischen Durchführung der technischen Durchführung der Versuche.

Summary

1. In rats in which overdosage with cortexone and sodium chloride has provoked hypertension, accompanied by a diminution in the pressor substances of freshly prepared kidney-extracts, the blood pressure reverts to normal and the content of these pressor substances rises again when the salt intake is reduced.

2. An overdosage of cortexone only, i. e. with no simultaneous administration of sodium chloride, produces neither hypertension nor a decline in the content of pressor substances in kidney-extracts.

3. An overdosage of sodium chloride, however, can provoke a rise in blood pressure and a fall in the level of pressor substances in the kidney, even when no cortexone is given at the same time.

4. Under the conditions in which the experiments were performed, both the increase in blood pressure and the decrease in pressor substances in kidney-extracts are reversible.

5. Cortexone and salt provoke typical alterations in the kidney and heart which are quantitatively less pronounced 3 weeks after the interruption of treatment. Cortexone alone does not produce similar lesions. There was no correspondence between the loss in blood pressure activity of the kidney-extracts and the morphological changes.

6. It is presumed that the pressor substances contained in kidney-extracts (probably consisting mainly of renin) not only have a hypertensive effect but are of physiological importance for renal function.

Literatur

Auerbach, S. H., G. R. Meneely, R. G. Tucker and W. J. Darby: Renal and vascular lesions induced in rats by a high salt diet. Federat. Proc. **12**, 384 (1953). — Braun-Menendez, F.: In CIBA Foundation Symposium on Hypertension p. 238. London: Churchill 1954. — Croxatto, H., L. Barnafi and J. Passi: Effect of renin on diuresis. Acta Physiol. Lat.-Amer. **2**, 159 (1952). — Croxatto, H., L. Barnafi, M. de la Lastra, R. de la Parra y R. Vera: Mecanismos que influyen en el efecto diuretica de la renina. Acta Physiol. Lat.-Amer. **3**, 74 (1953). — Friedman, S. M., C. L. Friedman and M. Nakashima: Sustained hypertension following the administration of desoxycorticosterone acetate. J. of Exper. Med. **93**, 361 (1950). — Goldblatt, H., H. Lamrfom and E. Haas: Physiological properties of renin and hypertensin. Amer. J. Physiol. **175**, 75 (1953). — Green, D. M., F. I. Saunders, N. Wallgren and R. C. Craig: Self-sustaining, post DCA-hypertensive cardiovascular disease. Amer. J. Physiol. **170**, 94 (1952). — Gross, F., u. F. Sulser: Pressorische Substanzen in den Nieren experimentell hypertonischer Ratten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 374 (1956). — Gross, F., P. Loustalot u. R. Meier: Vergleichende Untersuchungen über die hypertensive Wirkung von Aldosteron und Desoxycorticosteron. Experientia (Basel) **11**, 67 (1955). — Hartroft, P. M., and W. S. Hartroft: Studies on renal juxtaglomerular cells. I. Variations produced by sodium chloride and desoxycorticosterone acetate. J. of Exper. Med. **97**, 415 (1953). — Hughes-Jones, N. C., G. W. Pickering, P. H. Sanderson, H. Scarborough and J. Vanderbroucke: The nature of the of renin and hypertensin on renal function in rabbit. J. of Physiol. **109**, 288 (1949). — Meneely, G. R., R. G. Tucker, W. J. Darby and S. H. Auerbach: Chronic sodium chloride toxicity. Occurrence of hypertension and of a syndrome of edema and renal failure. Amer. J. Physiol. **171**, 750 (1952). — Pickering, G. W., and M. Prinzmetal: The effect of renin on urine formation. J. of Physiol. **98**, 314 (1940). — Sapirstein, L. A., W. L. Brandt and R. D. Drury: Production of hypertension in the rat by substituting hypertonic sodium chloride solutions for drinking water. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **73**, 82 (1950). — Sellers, A. L., St. Smith, H. C. Goodman and Jessie Marmorston: Effects of renin on excretion of sodium, chloride and water in the rat. Amer. J. Physiol. **166**, 619 (1951). — Selye, H.: Role of sodium chloride in production of nephrosclerosis by steroids. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **52**, 190 (1943). — Toussaint, Ch., R. Wolter et P. Sibille: Hypertension et lésions artérielles provoquées chez le rat par l'ingestion de quantités excessives de chlorure de sodium. Rev. belge Path. **23**, 83 (1953). — Zollinger, H. U., A. Hauser, H. Fehlmann u. G. Curti: Salzwasserhypertonie bei der Ratte. Schweiz. med. Wschr. **1954**, 1272.

Dr. F. Gross, Wissenschaftl. Laboratorien d. Ciba AG., Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 389—399 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald

Untersuchungen über den Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Hirudins*

Von
FRITZ MARKWARDT

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Juni 1956)

Trotz der starken Antriebe, welche die Erforschung des Blutgerinnungsmechanismus und seiner pharmakologischen Beeinflussung in der letzten Zeit erhalten hat, haben Untersuchungen über den blutgerinnungshemmenden Wirkstoff aus medizinischen Blutegeln, das Hirudin, keine bedeutenden Fortschritte gemacht. Unsere Kenntnisse über diesen Hemmstoff der Blutgerinnung sind im Gegensatz zu anderen Antikoagulantien lückenhaft, da wir im wesentlichen auf die Ergebnisse älterer Arbeiten angewiesen sind, die vorwiegend nur orientierenden Charakter haben.

Das Hirudin konnte bisher zwar mehr oder weniger angereichert, aber nicht rein dargestellt werden. Es wurde schon sehr frühzeitig vermutet, daß das fragliche aktive Prinzip ein eiweißähnlicher Körper sein müsse (DICKINSON, FRANZ). Indessen beziehen sich diese Vermutungen eben nicht auf das Verhalten der reinen Substanz. Allerdings wurde die Eiweißnatur des Hirudins wahrscheinlich gemacht, als WALDSCHMIDT-LEITZ u. Mitarb. unabhängig von der Darstellung des reinen Stoffes die Zerstörung der Aktivität von hirudinhaltigen Extrakten durch die Einwirkung proteolytischer Fermente zeigen konnten.

Die Wirkung des Hirudins wurde in verschiedener Weise gedeutet. Die größte Zahl der Untersuchungen stimmt zwar darin überein, daß die Wirkung auf das enzymatische System der Blutgerinnung zu beziehen sei, doch wird die Frage nach dem Angriffspunkt innerhalb dieses Systems sehr verschieden beantwortet. Es wurde das Hirudin sowohl als Antithrombin (HAYCRAFT, DICKINSON, MORAWITZ) wie auch als Antiprothrombin oder Antithrombokinase (SPIRO u. ELLINGER, FULD u. SPIRO, HOWELL, ARTHUS, LEE) angesehen. Schließlich wird dem Hirudin auch eine komplexe Wirkung auf Thrombinbildung und Thrombinwirkung zugeschrieben (MELLANBY, GRATIA [1]).

Die Aktivität der Hirudinpräparate wurde in den bisherigen Untersuchungen in der Weise bestimmt, daß man die Konzentration feststellte, welche die Spontangerinnung frisch entnommenen Blutes gerade noch total verhinderte oder indem man die Zeit bestimmte, um welche die normale Gerinnung des Blutes durch eine bestimmte Menge Hirudin verzögert wird. Diese Methoden geben nur grobe Orientierungsmöglichkeiten. Aus diesem Grunde ist es auch nicht möglich, die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen, soweit sie quantitative Ergebnisse anstrebten, miteinander zu vergleichen.

* Teilergebnisse dieser Arbeit wurden auf der Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Graz am 7. Sept. 1955 vorgetragen.

Die vorliegende Untersuchung bemüht sich um die Klärung des Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Hirudins und die Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Bestimmung des Stoffes.

Materialien

Citratblut: Wurde in üblicher Weise gewonnen durch Entnahme von 9 ml menschlichem Venenblut mit steriler Rekordspritze, die 1 ml m/10 Natriumcitratlösung enthält.

Fibrinogenlösung: Fibrinogen-Behring-Werke wurde in 0,9%iger Natriumchloridlösung gelöst.

Thrombokinaselösung: Der Inhalt einer Ampulle „Affenhirn-Thrombokinase-Behring-Werke, schnellöslich" wurde in 0,5 ml destillierten Wassers gelöst.

Prothrombin: Es wurde nach SEEGERS gereinigtes Prothrombin verwandt.

Thrombin: Gereinigtes, standardisiertes Thrombin wurde uns von den Behring-Werken, Marburg (1 mg = 300 N.I.H.-Einheiten), und von der Hoffmann-La Roche-AG, Grenzach/Baden (1 mg = 56 N.I.H.-Einheiten), zur Verfügung gestellt.

Hirudin: Das für die vorliegenden Versuche verwandte Hirudin wurde durch Extraktion aus zerkleinerten Blutegelköpfen mit 40%igem Aceton gewonnen und durch fraktionierte Fällung mit Alkohol und Trichloressigsäure von dem Hauptteil der unwirksamen Ballaststoffe befreit. Aktivität = 680 Antithrombin-Einheiten/mg. Die systematische Steigerung des Reinheitsgrades bis zur reinen Substanz, über die bereits in einer kurzen Mitteilung berichtet wurde (MARKWARDT [1]), wird in einer folgenden Veröffentlichung ausführlich beschrieben.

Alle Substanzen wurden im frisch gelösten Zustand benutzt.

Versuchsergebnisse

1. Untersuchungen am Citratblut

Die Untersuchung der Hirudinwirkung am Blutplasma wies bereits darauf hin, daß die beobachtete Hemmung der Gerinnung nicht auf eine Verhinderung der Thrombinbildung, sondern auf eine Reaktion mit dem Thrombin selbst zurückzuführen ist. Bestimmt man die Abhängigkeit der Gerinnungszeit des Blutes von der Hirudinkonzentration (Abb. 1), so steigt die Gerinnungszeit mit wachsender Hirudinkonzentration rasch an und von einer bestimmten Konzentration ab ist die Gerinnung des Blutes total gehemmt, so daß auch nach Tagen keine Gerinnung zu beobachten ist. Wird die gleiche Bestimmung mit einem Zusatz von Thrombokinase durchgeführt, so wird zwar die Gerinnung des Hirudinblutes beschleunigt, aber die Konzentration an Hirudin, welche gerade zur Erreichung einer totalen Gerinnungshemmung ausreicht, wird durch einen Überschuß von Thrombokinase nicht erhöht. Total gehemmte Ansätze können auch durch Zusatz noch größerer Thrombokinasemengen nicht koaguliert werden.

Der Vorgang ist danach in folgende Einzelreaktionen aufzulösen: Nach dem Recalcifizieren des Citratblutes beginnt die Bildung von Thrombin aus dem im Plasma vorhandenen Prothrombin. Jedes neu

gebildete Thrombinmolekül wird aber vom Hirudin gebunden und inaktiviert. In dem Augenblick, wo durch diese Reaktion alles vorhandene Hirudin verbraucht ist, wird jedes weitere gebildete Thrombinmolekül seine Aktivität entfalten und es wird eine, wenn auch mehr oder weniger verzögerte, Fibrinbildung einsetzen. Wird die Hirudinmenge mehr und mehr gesteigert, so erreicht sie einen Überschuß über die Thrombinmenge, welche maximal aus dem vorhandenen Prothrombin gebildet werden kann; dann bleibt das Blut ungeronnen. Durch Zusatz von Thrombokinase wird nur die Geschwindigkeit der Umwandlung des Prothrombins in Thrombin und damit die Geschwindigkeit der „Hirudin-Neutralisation" erhöht, nicht aber die Gerinnbarkeit des mit Hirudin im Überschuß versetzten Blutes wiederhergestellt. Diese Deutung der Beobachtung setzt allerdings voraus, daß die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin schneller ist als die Fermentwirkung des Thrombins.

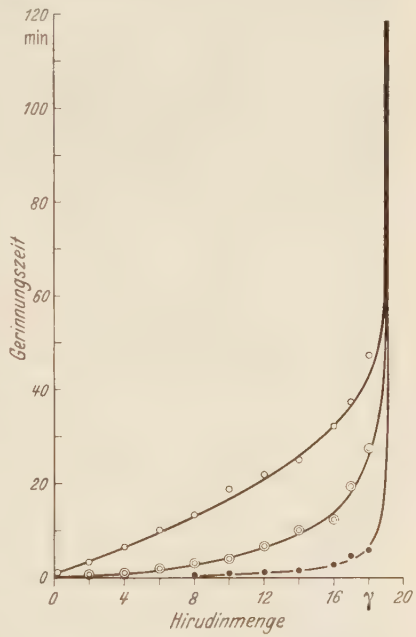


Abb. 1. Abhängigkeit der Gerinnungszeit recalcifizierten Citratblutes mit und ohne Thrombokinasezusatz von der Hirudinkonzentration. ○ ohne Thrombokinasezusatz; ● mit Thrombokinaselösung; ◎ mit Thrombokinaselösung 1:5 verdünnt. Versuchsansatz: Je 0,1 ml Hirudinlösung steigender Konzentration und 0,1 ml Thrombokinaselösung bzw. destillierten Wassers wurden mit 0,2 ml Citratblut in einem bei 37° im Thermostaten stehenden Reagensglas gemischt. Nach 1 min wurden 0,2 ml m/40 $CaCl_2$-Lösung hinzugegeben und die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung ermittelt

2. Untersuchungen an der isolierten zweiten Phase der Blutgerinnung

Die Richtigkeit der über den Angriffspunkt des Hirudins entwickelten Vorstellungen war nun an der isolierten zweiten Phase der Blutgerinnung unter Verwendung der reinen Gerinnungsfaktoren zu prüfen.

Eine reine Fibrinogenlösung wird durch eine bestimmte Menge gereinigten Thrombins zum Gerinnen gebracht. Bei Zusatz einer genügenden Menge Hirudin ist die gleiche Menge Thrombin nicht mehr fähig, das Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln oder, anders ausgedrückt, das Ferment Thrombin ist in seiner Aktivität gehemmt. Die mit Hirudin versetzte Fibrinogenlösung gerinnt erst auf Zusatz weiterer Thrombinmengen. Mißt man die zur Gerinnung einer hirudinhaltigen Fibrinogenlösung benötigte Menge Thrombin (Abb. 2), so zeigt sich, daß diese der angewandten Menge Hirudin direkt proportional ist. Mit anderen Worten:

eine bestimmte Menge Hirudin blockiert stets eine äquivalente Menge Thrombin. Bei der Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin verliert nicht nur das Thrombin seine Fermentaktivität, sondern im gleichen Umfang geht auch das Hirudin seiner biologischen Wirkung verlustig. Die Reaktion verläuft demnach nach folgendem einfachen Schema:

$$\underset{\text{aktiv}}{\text{Thrombin}} + \underset{\text{aktiv}}{\text{Hirudin}} = \underset{\text{inaktiv}}{\text{Thrombin-Hirudin}}$$

Somit scheidet auch die Möglichkeit einer fermentativ zerstörenden Wirkung des Hirudins auf das Thrombin aus, und es erweist sich, daß das Hirudin allein (ohne die Anwesenheit im Plasma vorhandener Komponenten) seine antikoagulierende Wirkung entfaltet.

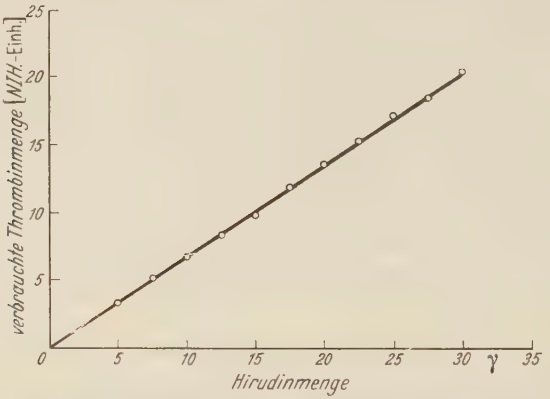


Abb. 2. Die Abhängigkeit der zur Gerinnung benötigten Menge Thrombin vom Hirudingehalt der Fibrinogenlösung. Versuchsansatz: In Reagensgläschen von 2 ml Inhalt (Durchmesser 7—8 mm) wurden jeweils 0,1 ml Hirudinlösung steigender Konzentration mit 0,2 ml 0,5%iger Fibrinogenlösung gemischt. In Abständen von 1 min wurden 0,005 ml Thrombinlösung (1 ml = 100 N.I.H.-E., gelöst in destilliertem Wasser) aus einer Mikrobürette (Ablesegenauigkeit 0,001 ml) hinzugefügt, bis die Probe geronnen ist. Nach jedem Thrombinzusatz wurde die Probe sofort durch vorsichtiges Schütteln gut durchgemischt

3. Entwicklung einer Hirudinbestimmungsmethode

Da die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin stöchiometrisch erfolgt, ergibt sich die Möglichkeit, eine quantitative und reproduzierbare Hirudinbestimmung durchzuführen, die den Vorteil hat, daß sie sich auf die biologische Wirkung des Antikoagulans stützt.

Die jetzt zu beschreibende Methode zur Hirudinbestimmung wird als *Hirudin-Titration* bezeichnet. Sie beruht auf folgendem Prinzip: eine mit Hirudin versetzte Fibrinogenlösung bleibt auf steigenden Zusatz von Thrombin so lange ungeronnen, bis alles Hirudin neutralisiert ist. Ein Überschuß an Thrombin macht sich innerhalb weniger Sekunden an der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin bemerkbar.

Die Bestimmung wird in der für chemische Titrationen geläufigen Technik durchgeführt, indem eine Vorlage mit der zu bestimmenden

Substanz (Hirudin) und einem Indicator (Fibrinogen) beschickt und aus einer Bürette die neutralisierende Lösung (Thrombin) hinzugefügt wird, bis der Umschlagspunkt des Indicators erreicht ist. Der Umschlagspunkt ist eben die Gerinnung des Fibrinogens.

Durchführung der Bestimmung. 0,01—0,1 ml der zu testenden Hirudinlösung werden mit 0,1 ml Veronal-Acetat-Puffer p_H 7,0 nach MICHAELIS und 0,1 ml 1%iger Fibrinogenlösung gemischt und durch stufenweise Zugabe einer standardisierten Thrombinlösung (1 ml = 100 N. I. H.-Einheiten) bei Zimmertemperatur, wie unter Abbildung 2 beschrieben, titriert.

Da der Indicator (Fibrinogen) zur Erreichung seines Umschlagspunktes (Gerinnung) Zeit benötigt, kann man nicht wie bei den meisten chemischen Titrationen in einem Zuge bis zum Umschlagspunkt titrieren. Es werden vielmehr in Abständen von 1 min 0,005 ml Thrombinlösung (entsprechend 0,5 N.I.H.-Einheiten) zugesetzt. Ist die ungefähre Größe der zu verbrauchenden Thrombinmenge bekannt (z. B. bei Wiederholung der Titration oder nach orientierender Vortitration), so kann man auch zunächst größere Mengen in kurzer Zeit hinzugeben und die langsame Zugabe erst kurz vor dem Umschlagspunkt beginnen.

Der „Neutralpunkt" gilt als erreicht, wenn die Fibrinogenlösung innerhalb 1 min geronnen ist. Die Lösung gilt dann als geronnen, wenn sich ein einheitliches Gerinnsel gebildet hat und das Reagensglas auf den Kopf gestellt werden kann, ohne daß etwas ausläuft. Sind nur kleine nicht zusammenhängende Fibrinfäden zu sehen, so wird weiter titriert.

Die Konzentration der Hirudinlösung wird so gewählt, daß zwischen 0 und 0,2 ml Thrombinzugabe der Umschlag erreicht wird. Anstelle von Fibrinogenlösung kann auch Citratplasma verwandt werden. Der durch den Antithrombingehalt des Plasmas entstehende Mehrverbrauch an Thrombin kann vernachlässigt werden, da er innerhalb der Fehlerbreite der Methode liegt. Auf die Verwendung eines Thermostaten kann verzichtet werden, da die normalen Schwankungen der Zimmertemperatur — unter Berücksichtigung der Fehlerbreite der Methode — ohne Einfluß auf das Meßergebnis sind.

Da Thrombin nach N. I. H.-Einheiten standardisiert ist, ist es möglich, die gemessene Aktivität des Hirudins auf einen internationalen Standard zu beziehen. Die Wirksamkeit des Hirudins wird daher in *Antithrombin-Einheiten* (AT.-E.) angegeben, wobei eine AT.-Einheit derjenigen Menge Hirudin entspricht, die notwendig ist, um eine N. I. H.-Einheit[1] Thrombin unter den angegebenen Versuchsbedingungen in ihrer fermentativen Wirkung auf das Fibrinogen zu blockieren.

Genauigkeit der Hirudintitration:

Zur Feststellung der Fehlergrenze der Methode wurden 20 Hirudinlösungen (Hirudingehalt steigend von 0—20 AT.-E.) je 12mal ausgetestet. Die größte Abweichung der Einzelbestimmung vom Mittelwert betrug $\pm$ 0,6 AT.-E. Der mittlere Fehler (Standardabweichung) σ wurde nach dem GAUSSschen Fehlergesetz mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate zu $\pm$ 0,2 AT.-E. errechnet.

---

[1] National Institutes of Health, Divisions of Biologics Control, Minimum requirements for dried thrombin, Bethesda, 2nd revision 1946.

4. Abhängigkeit der Thrombininaktivierung durch Hirudin von der Einwirkungszeit und Temperatur

Eine meßbare Abhängigkeit der Hirudinwirkung von der Einwirkungszeit und -temperatur konnte nicht beobachtet werden. Versetzt man eine bestimmte Menge Hirudinlösung mit einer verhältnismäßig größeren Thrombinmenge, so zeigt sich, daß unabhängig von der Verlängerung der Einwirkungszeit bis auf 120 min oder Steigerung der Temperatur zwischen 10° und 40°C immer die gleiche Menge Thrombin blockiert wird, wie man jeweils durch Messung der Gerinnungsaktivität des restlichen, freien Thrombins erkennen kann. Man muß daher annehmen, daß die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin mit großer Geschwindigkeit verläuft und einen niedrigen Temperaturkoeffizienten besitzt. Sie ist zumindest schon bei 10°C innerhalb weniger Sekunden beendet.

Versuchsansatz. In 4 Ansätzen wurden je 0,95 ml Hirudinlösung (enthaltend 95 AT.-E. Hirudin, gelöst in Veronal-Acetat-Puffer p_H 7,0) mit 1,05 ml Thrombinlösung (enthaltend 105 N.I.H.-E. Thrombin), also mit einem Überschuß von 10 N.I.H.-E. Thrombin, versetzt. Die Ansätze wurden bei 10, 20, 30 und 40°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden je 1,9 ml Pufferlösung mit 0,1 ml Thrombinlösung (enthaltend 10 N.I.H.-E. Thrombin) gemischt und in gleicher Weise behandelt. In Abständen von 15 sec, 5 min, 30 min und 120 min wurden je 0,2 ml (= der 10. Teil) aus den Ansätzen entnommen, mit 0,3 ml 0,4%iger Fibrinogenlösung von gleicher Temperatur gemischt und die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung bestimmt. Die gemessenen Gerinnungszeiten entsprachen im Vergleich zur Kontrolle, wie zu erwarten war, einer restlichen Thrombinmenge von 1,0 ± 0,2 N.I.H.-Einheiten.

5. Beziehungen zwischen der koagulierenden Aktivität des Thrombins und seiner Bindungsfähigkeit für Hirudin

SEEGERS u. Mitarb. [2] haben gezeigt, daß hochgereinigtes Prothrombin in 25%iger Na-Citrat-Lösung auch ohne die Mitwirkung von Thrombokinase, Calciumionen und Acceleratoren in Thrombin übergehen kann. Verfolgt man die Aktivierung des Prothrombins in einem derartigen Umwandlungsansatz (Abb. 3), so zeigt sich, daß die Zunahme der spezifischen koagulierenden Aktivität (gemessen in N. I. H.-Einheiten) mit der Zunahme der Bindungsfähigkeit für Hirudin (gemessen in verbrauchter Hirudinmenge in AT.-E.) parallel geht. Das Thrombin hat unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur eine begrenzte Lebensdauer. In dem gleichen Maße, wie das gebildete Thrombin später während der langen Versuchsdauer an Gerinnungsaktivität verliert (absteigender Teil der Kurve in Abb. 3), geht deshalb auch die Bindungsfähigkeit für Hirudin zurück. Es wird daher für berechtigt gehalten, die Aktivität des Thrombins auch durch Messung der von ihm „neutralisierten" Menge Hirudin zu bestimmen.

6. Versuche zur Trennung der Hirudin-Thrombin-Verbindung

Die Bildung der Additionsverbindung zwischen Hirudin und Thrombin konnte bereits mit Hilfe eines einfachen elektrophoretischen Verfahrens anschaulich gemacht werden (MARKWARDT [2]), indem gezeigt wurde, daß beim Zusammentreffen der beiden Reaktionspartner eine elektrophoretisch nicht mehr trennbare Verbindung entsteht. Unter Benutzung der gleichen Methode konnte auch die Frage entschieden

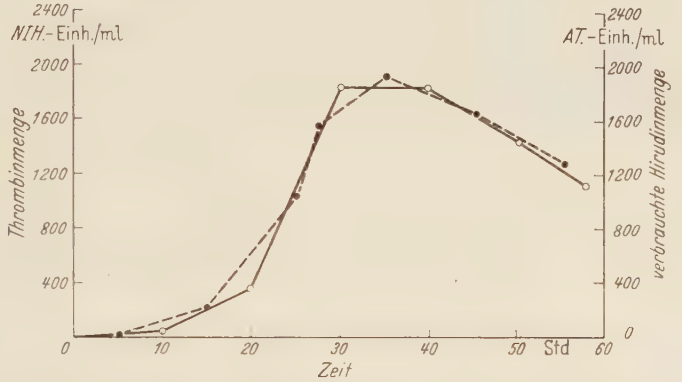


Abb. 3. Aktivierung gereinigten Prothrombins in 25%iger Na-Citratlösung bei 25° p_H 7,2. 15 mg Prothrombin gelöst in 3 ml Citratlösung. o Aktivität in N.I.H.-E.; • Verbrauchte Hirudinmenge in AT.-E. In bestimmten Zeitabständen wurde dem Umwandlungsansatz ein aliquoter Teil entnommen und auf seine Gerinnungsaktivität und Bindungsfähigkeit für Hirudin untersucht.

Die gerinnungsauslösende Aktivität wurde nach den Angaben von SEEGERS [1] an einer 0,2%igen Fibrinogenlösung getestet. Dabei wird die Menge des freigelegten Thrombins ermittelt, indem die Proben mit Wasser so weit verdünnt werden, bis die gleiche Gerinnungszeit wie von einem vergleichsweise geprüften standardisierten Thrombin erhalten wird.

Die hirudinneutralisierende Wirkung wurde bestimmt, indem 0,1 ml der bis auf einen Thrombingehalt von 0—200 N.I.H.-E./ml verdünnten Probe mit 0,1 ml Hirudinlösung (enthaltend 20 AT.-E.) versetzt und das nicht gebundene Hirudin mit einer standardisierten Thrombinlösung, wie unter Abschnitt 3, beschrieben, zurücktitriert wurde

werden, ob der gebildete Komplex eine lockere oder feste Additionsverbindung darstellt. Im ersteren Falle hätten sich die beiden Komponenten auf Grund ihrer unterschiedlichen elektrochemischen Eigenschaften (Hirudin I. P.. bei p_H 3,8; Thrombin I. P. bei p_H 4,7) im weiteren Verlauf der Elektrophorese entsprechend ihrer allmählichen Abdissoziation aus dem Komplex wieder trennen müssen. Die Hirudin-Thrombin-Verbindung wandert aber bei Verwendung von Pufferlösungen zwischen p_H 4,0—9,5 geschlossen im elektrischen Feld und ist daher bei neutralem, schwach alkalischem und schwach saurem Milieu offensichtlich beständig. Dagegen scheint sie im stark sauren Milieu mit steigender Wasserstoffionen-Konzentration in ihre Komponenten zu dissoziieren und auch im stark alkalischen Gebiet nicht mehr beständig zu sein, was sich an dem Wiederauftreten freien Hirudins nach der Elektrophorese bemerkbar macht. Leider werden Versuche zur quantitativen Bestimmung der

Dissoziation beider Komponenten bei hoher Säure- oder Basenkonzentration dadurch gestört, daß Thrombin unterhalb p_H 3,5 und oberhalb p_H 10,0 denaturiert wird. Es konnte aber gezeigt werden, daß das Hirudin aus der Hirudin-Thrombin-Verbindung durch Ansäuern auf $p_H < 2{,}0$ oder Alkalisieren auf $p_H > 12{,}0$ der Lösung bei 20° nach 5 min quantitativ in Freiheit gesetzt wird, was an der erneut auftretenden Wirkung gegen frisches Thrombin erkannt werden kann (siehe Tab. 1). Während Hirudin die Säure- oder Laugeneinwirkung ohne Aktivitätsverlust übersteht, wird Thrombin dadurch irreversibel inaktiviert. An Hand dieser Versuchsergebnisse läßt sich allerdings nicht entscheiden, ob die Abtrennung des Hirudins im stark sauren und stark alkalischen Milieu primär eine Dissoziation mit anschließender Thrombindenaturierung ist, oder ob sie die alleinige Folge der Denaturierung des Thrombinanteils ist.

Tabelle 1. *Spaltung der Hirudin-Thrombin-Verbindung durch Säure und Lauge*

	Aktivität	Aktivität nach 5 min langer Einwirkung bei 20° C von	
		HCl (p_H 2,0)	NaOH (p_H 12,0)
Hirudin + Thrombin . .	—	49,0 AT.-E.	48,5 AT.-E.
Hirudin	50 AT.-E.	49,5 AT.-E.	49,0 AT.-E.
Thrombin . . .	50 N.I.H.-E.	0,5 N.I.H.-E.	0,2 N.I.H.-E.

Versuchsanordnung. Zur Bildung der inaktiven Hirudin-Thrombin-Verbindung wurde eine Hirudinlösung (500 AT.-E. in 0,5 ml Wasser) mit der äquivalenten Menge Thrombinlösung (500 N.I.H.-E. in 0,5 ml Wasser) gemischt. Werden 0,1 ml dieser Lösung mit 0,2 ml Fibrinogenlösung versetzt, so darf die Probe innerhalb 1 min nicht gerinnen, muß aber auf Zusatz von 0,5 N.I.H.-E. Thrombin innerhalb 1 min erstarren. 0,1 ml dieser Lösung wurden durch Zugabe von n/5 HCl auf p_H 2,0 und durch Zugabe von n/5 NaOH auf p_H 12 eingestellt (Glaselektrode). Nach 5 min wurden die Lösungen durch Zugabe der äquivalenten Menge NaOH bzw. HCl wieder neutralisiert und auf ihren Gehalt an Hirudin durch Titration mit Thrombin untersucht. Eine Hirudinlösung und eine Thrombinlösung werden zur Kontrolle in gleicher Weise behandelt. Der Thrombingehalt wurde durch Bestimmung der „Hirudinneutralisation" wie in Abschnitt 5 ermittelt.

GRATIA [2] hat aus einem Hirudin und Thrombin enthaltenden Gemisch, das keine Hirudinwirkung mehr zeigte, durch Erwärmen auf 56°C wieder wirksames Hirudin erhalten können. Diese Feststellung gab Veranlassung, das Verhalten der Hirudin-Thrombin-Verbindung beim Erwärmen genauer zu untersuchen (Abb. 4). Hirudin läßt sich, wie die Abbildung zeigt, aus der inaktiven Hirudin-Thrombin-Verbindung durch Erhitzen der Lösung auf Temperaturen, bei welchen das Thrombin denaturiert wird, wieder in Freiheit setzen, was an der erneut auftretenden Hemmwirkung gegenüber aktivem Thrombin erkannt werden kann. Es

ist bemerkenswert, daß das Thrombin im inaktiven Hirudin-Thrombin-Komplex gegenüber Hitze deutlich stabiler ist als im freien aktiven Zustand. Die Inaktivierung des gebundenen Thrombins ist, gemessen an der „Neutralisation" der Hirudinwirkung, erst bei höheren Temperaturen oder bei längerem Erhitzen im Vergleich zum freien Thrombin möglich. — Als wichtigstes Ergebnis ist festzuhalten, daß durch 15 min langes Erhitzen des inaktiven Hirudin-Thrombin-Komplexes bei 80°C das gebundene Hirudin fast quantitativ in aktivem Zustand in Freiheit gesetzt werden kann.

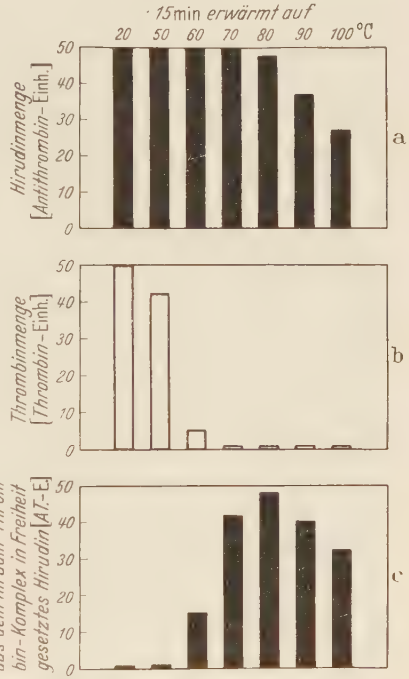


Abb. 4. Das Verhalten von a Hirudin, b Thrombin und c Hirudin-Thrombin-Verbindung beim Erwärmen auf verschiedene Temperaturen. Versuchsanordnung: Je 0,1 ml der inaktiven Hirudin-ThrombinLösung (enthaltend 50 N.I.H.-E. Thrombin und 50 AT.-E. Hirudin, gelöst in isotonischem Phosphatpuffer p_H 7,0) wurden jeweils 15 min auf 50, 60, 70, 80, 90 und 100° C erhitzt. Zur Kontrolle wurden jeweils 0,1 ml einer Hirudinlösung und 0,1 ml einer Thrombinlösung in gleicher Weise behandelt. Nach dem Erkalten wurden die Ansätze auf ihren Gehalt an Hirudin bzw. Thrombin untersucht, wie vorher beschrieben

Bemerkungen zu den Versuchsergebnissen

I

Nach den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich beim Hirudin um einen natürlichen Hemmungskörper, der vom Blutegel zum Zwecke der Ausschaltung der Thrombinwirkung gebildet wird. Es liegt daher nahe, das Hirudin mit bekannten Stoffen dieser Wirkungsart zu vergleichen und zu versuchen, es in eine bestimmte Gruppe von Fermenthemmstoffen einzuordnen.

Nach parenteraler Einverleibung von Enzymen werden bekanntlich im Organismus spezifische Antikörper gebildet, die häufig als Hemmungskörper des Enzyms wirken. Dies trifft auch für das Thrombin zu (Bordet [1]). Injiziert man einem Meerschweinchen aus Kaninchenblut gewonnenes Thrombin in geringen Dosen intravenös, so erlangt sein Blut die Fähigkeit, die Wirksamkeit des Kaninchenthrombins abzuschwächen. Diese Antithrombinwirksamkeit ist aber nur gegen das Thrombin des Kaninchenblutes gerichtet. Die Thrombine anderer Tierarten bleiben unbeeinflußt. Von diesen als Antienzyme bezeichneten Antikörpern unterscheidet sich das

Hirudin schon dadurch, daß es das Thrombin aus dem Blut sehr verschiedener Species hemmt, sogar dann, wenn diese phylogenetisch weit voneinander entfernt sind.

Das Hirudin läßt sich aber leicht in die Gruppe der natürlichen proteinartigen Fermentinhibitoren einordnen, die von Organismen zum Zwecke der Ausschaltung oder Regulierung von Enzymfunktionen gebildet werden. Sie sind zwar spezifisch auf das Enzym gerichtet, aber nicht artspezifisch wie die durch Immunisierung hervorgerufenen Antienzyme. Die am längsten bekannten Beispiele für solche Stoffe sind antipeptische und antitryptische Hemmstoffe, die von verschiedenen Darmparasiten gebildet werden, um sich vor dem Angriff der Verdauungsenzyme des Wirtsorganismus zu schützen (WEINLAND, MENDEL). Unter den natürlichen Hemmstoffen interessieren besonders die Trypsininhibitoren, die von KUNITZ u. NORTHROP zuerst aus Pankreas isoliert wurden. Soweit man die Eigenschaften der Trypsininhibitoren übersieht (Übersicht bei GREEN u. NEURATH), zeigen sie dem Hirudin analoge Eigenschaften. Sie vereinigen sich gleichfalls bei neutraler Reaktion schnell mit stöchiometrisch gleichen Mengen des Fermentes zu einer inaktiven Ferment-Inhibitorverbindung, aus welcher der hitzestabile Inhibitor durch Hitzedenaturierung des Fermentes oder Verschiebung des p_H-Wertes wieder in Freiheit gesetzt und zurückgewonnen werden kann.

Die Antithrombinwirkung des normalen menschlichen Blutes wird auf bisher 4 bekannte Faktoren zurückgeführt (Zusammenstellung bei DEUTSCH), von denen aber keiner Eigenschaften wie das Hirudin aufweist.

II

Nachdem das gegenseitige Neutralisationsverhältnis zwischen Hirudin und Thrombin erkannt ist, kann man also nicht nur das Hirudin durch Thrombin quantitativ bestimmen, sondern auch umgekehrt Thrombinbestimmungen mit Hirudin durchführen, zumal sich gezeigt hat, daß nur Thrombin in aktiver Form mit Hirudin reagiert. Dieser Feststellung kommt vielleicht auch eine gewisse praktische Bedeutung zu, da auf diese Weise die Möglichkeit einer einfachen und schnellen quantitativen Thrombinbestimmung durch Titration mit standardisiertem Hirudin gegeben ist.

Zusammenfassung

Hirudin vereinigt sich mit stöchiometrisch äquivalenten Mengen aktiven Thrombins augenblicklich zu einer zwischen p_H 4,0—9,5 beständigen Additionsverbindung, wodurch die katalytische Wirkung des Thrombins auf die Blutgerinnung momentan zum Erlöschen gebracht wird. Aus dieser Verbindung kann das Hirudin bei starker Säure- und

Basenkonzentration ($p_H < 2{,}0$ und $p_H > 12{,}0$) und durch 15 min langes Erhitzen auf 80 °C quantitativ in Freiheit gesetzt werden.

Es wird eine einfache Methode zur quantitativen Hirudinbestimmung durch Titration mit Thrombin entwickelt. Die Wirksamkeit des Hirudins kann danach in Antithrombineinheiten angegeben werden.

Literatur

Arthus, M.: Arch. internat. Physiol. **15**, 203 (1920). — [1] Bordet, J., et O. Gengou: Ann. Inst. Pasteur **15**, 129 (1901). — Deutsch, E.: Blutgerinnungsfaktoren. Wien: Deuticke 1955. — Dickinson, W. L.: J. of Physiol. **11**, 566 (1890). — Franz, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **49**, 342 (1903). — Fuld, E., u. K. Spiro: Beitr. chem. Phys. Path. **5**, 171 (1904). — [1] Gratia, A.: Ann. Inst. Pasteur **35**, 513 (1921). — [2] Gratia, A.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **83**, 313 (1920). — Green, M., and H. Neurath: In Neurath u. Baley: The Proteins. Vol. II Part B, New York: Academic Press Inc. 1954. — Haycraft, J. B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **18**, 209 (1884). Howell, W. H.: Amer. J. Physiol. **29**, 187 (1911/12). — Kunitz, M., and H. J. Northrop: J. Gen. Physiol. **19**, 991 (1936). — Lee, K. S.: Fol. pharmacol. Jap. **22**, 36 (1936). — [1] Markwardt, F.: Naturwissenschaften **42**, 537 (1955). — [2] Markwardt, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 220 (1956). — Mellanby, J.: J. of Physiol. **38**, 441 (1909). — Mendel, L. D., and A. F. Blood: J. of Biol. Chem. **8**, 177 (1910). — Morawitz, P.: Dtsch. Arch. klin. Med. **79**, 1, 215, 432 (1904). — [1] Seegers, W. H., and Ph. Smith: Amer. J. Physiol. **137**, 567 (1942). - [2] Seegers, W. H.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 677 (1949). — Circulation (New York) **1**, 2 (1950). — Seegers, W. H., R. L. McLaughry and J. L. Fahey: Blood **5**, 421 (1950). — Spiro, K., u. A. Ellinger: Z. physiol. Chem. **23**, 121 (1897). — Waldschmidt-Leitz, E., P. Stadler u. F. Steigerwaldt: Z. physiol. Chem. **183**, 39 (1929). — Weinland, E.: Z. Biol. **44**, 1 (1903).

Dr. Fritz Markwardt, Greifswald, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 400—407 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann)

Versuchstierart und Testergebnis bei Prüfung schmerz- und hustenstillender Arzneimittel

Von
Hans Friebel und Claus Reichle

(Eingegangen am 12. Juli 1956)

Nach einer wohl allgemein für zutreffend gehaltenen Ansicht kann bei keinem Tiertest zur Analgesie-Prüfung das Auftreten der Reaktion als Beweis für eine Schmerzempfindung der Tiere angesehen werden.

Wirth hält dies keineswegs entscheidend für die Beurteilung der Methoden; er schreibt: „Wichtig ist aber die Tatsache, daß die Reizschwelle für die geschilderten Tierreaktionen für zentral analgetisch wirksame Stoffe in gleichem Sinne verändert werde wie die Schmerzschwelle beim Menschen, wenn auch die quantitative Einstufung der Stoffe je nach Methode gewisse Abweichungen zeigt, was angesichts der verschiedenen Tierarten und verschiedenen Reizqualitäten nicht wunder nimmt . . ."

Von den Faktoren, welche für eine mangelhafte Übertragbarkeit verantwortlich gemacht werden, sind die technischen Verfahren zur Schmerzerzeugung und ihre Problematik in sehr vielen experimentellen Arbeiten detailliert untersucht worden. (Übersicht bei Wirth sowie Fleisch u. Dolivo.) Die artbedingten Eigenschaften der Versuchstiere hingegen wurden bisher vorwiegend in Form allgemein gehaltener Beurteilungen berücksichtigt; umfangreichere vergleichende experimentelle Untersuchungen, die mit derselben Methode an verschiedenen Tierarten durchgeführt wurden, liegen unseres Wissens nicht vor. Für die Bestimmung der hustenhemmenden Wirkung gilt sinngemäß das gleiche.

Wir haben uns daher bemüht, die Kenntnisse vom artbedingten Faktor zu erweitern, denn bereits bei früheren Arbeiten über analgetische und hustenhemmende Arzneimittelwirkungen hatte sich gezeigt, daß der artbedingte Faktor das Testergebnis wesentlich beeinflußt.

Methoden

Verglichen wurde die Verhaltensweise von Mäusen, Ratten und Meerschweinchen gegenüber Analgetica im Analgesietest und die Reaktionsweise von Ratten und Meerschweinchen bei der Prüfung auf hustenhemmende Wirkung. Bei Analgesieversuchen an Mäusen wurde der Schmerzreflex durch Wärmereizung bzw. elektrische Reizung am Schwanz provoziert. Einzelheiten der Arbeitweise bei Friebel u. Reichle. An Ratten und Meerschweinchen lösten wir durch Wärmereizung der geschorenen Rückenhaut den „twitch"-Reflex aus. Einzelheiten bei Friebel, Reichle u. von Graevenitz. Die Hemmung des Hustenreflexes konnte an Ratten

und Meerschweinchen vergleichend geprüft werden. Bei ihnen wurden die sensiblen Organe im Tracheobronchialraum durch Inhalation eines SO_2-Luftgemisches irritiert. Einzelheiten bei FRIEBEL, REICHLE u. VON GRAEVENITZ sowie REICHLE u. FRIEBEL. Folgende Prüfstoffe wurden verwandt: Morphinum hydrochl., Codein. phosphor., Narkotin. hydrochl., Dicodid-Hydrochlorid, Paracodin-Bitartrat, ferner in Form ihrer handelsüblichen Salze Dilaudid[1], Eukodal[1], Acedicon[1], Dionin[1], Dolantin[1], Cliradon[1], Polamidon[1], Hoechst 10582 (Ticarda[1]-Wirkstoff), Dromoran[1], Romilar[1] sowie Pyramidon[1]. Ein Teil der Testergebnisse konnte aus den schon genannten Arbeiten von FRIEBEL u. Mitarb. übernommen werden.

Ergebnisse und Diskussion

In der Tab. 1 ist angegeben, welche Arzneimitteldosen bei 50% der Versuchstiere (Mäuse, Ratten, Meerschweinchen) Analgesie gegenüber der Wärmereizung hervorrufen.

Bei der Maus ließ sich in der Regel mit den geringsten Dosen Analgesie hervorrufen; nur Eukodal war bei der Ratte in noch geringerer Dosierung wirksam. Sonst mußte der Ratte durchschnittlich das 1,25fache gegeben werden, Meerschweinchen dagegen benötigten gegenüber Mäusen durchschnittlich die 6,2fache Arzneimittelmenge; außerdem zeigte sich bei ihnen, daß die Reihenfolge von den stark- zu den schwachwirkenden Stoffen in anderer Anordnung verläuft als bei Mäusen und Ratten.

Tab. 2 zeigt die hustenhemmende Wirkung der Prüfstoffe auf Ratten und Meerschweinchen.

Auch hier verläuft die dosisabhängige Reihenfolge bei Ratte und Meerschweinchen nicht völlig übereinstimmend. Ein wesentlicher Unterschied gegenüber den Ergebnissen der Analgesie-Versuche besteht aber insofern, als den Meerschweinchen bei diesem Test nicht das Mehrfache der für Ratten erforderlichen Dosis verabreicht werden mußte, vielmehr ließen sich die Hustenreizfolgen bei beiden Tierarten durch ähnliche Arzneimitteldosen unterdrücken (durchschnittlicher Quotient 1,1). Hervorgehoben werden muß vor allem, daß Meerschweinchen zur Hemmung des Hustens wesentlich geringere Arzneimitteldosen als zur Schmerzreflexhemmung benötigten. Bei Ratten lag die schmerzhemmende Dosis näher bei der hustenhemmenden.

Es müssen demnach mehrere artbedingte Faktoren das Ergebnis der Arzneimittelprüfung beeinflussen: die allgemeine Arzneimittelempfindlichkeit einer Tierart und ihr spezielles Reaktionsvermögen gegenüber einzelnen Prüfstoffen. Das Ausmaß der durch artbedingte Einflüsse zustande kommenden Differenzen wird beim Vergleich der Ergebnisse in den Tab. 1 und 2 mit denen der Tab. 3 deutlich. Die Verhältniszahlen der Tab. 3 zeigen die Auswirkung eines Wechsels der Arbeitstechnik: Schmerzreizung mit Wärme gegenüber elektrischer Reizung an der Maus. Die Hemmung des elektrisch erzeugten

[1] Warenzeichen, chemische Bezeichnungen am Schluß der Arbeit.

Tabelle 1. *Ergebnisse der Analgesieprüfung bei Wärmereizung*
In der 2. bis 4. senkrechten Spalte sind die ED_{50} der Prüfstoffe mit ihren Grenzen für 95% Wahrscheinlichkeit angegeben. Die letzte Spalte zeigt das Dosisverhältnis zwischen den 3 Tierarten an

Analgeticum	I Maus ED_{50} mg/kg	II Ratte ED_{50} mg/kg	III Meerschweinchen ED_{50} mg/kg	Quotient von I:II:III bezogen auf die ED_{50} Maus = 1
Dilaudid	0,25 (0,19— 0,32)		3,1 (2,42— 3,96)	1 : : 12,4
Dromoran	0,37 (0,26— 0,40)		7,3 (6,4 — 8,32)	1 : : 19,7
Eukodal	0,68 (0,59— 0,77)	0,48 (0,43— 0,53)	2,1 (1,55— 3,02)	1 : 0,7 : 3,1
Cliradon	0,96 (0,81— 1,13)	1,5 (1,37— 1,63)	10,0 (8,33—12,0)	1 : 1,6 : 10,4
Polamidon	1,4 (1,2 — 1,62)	1,8 (1,53— 2,1)	3,7 (3,01— 4,55)	1 : 1,3 : 2,6
Acedicon	1,51 (1,3 — 1,75)		9,0 (8,57— 9,45)	1 : : 6,0
Dicodid	1,6 (1,28— 2,0)	1,9 (1,79— 2,01)	9,2 (8,29—10,21)	1 : 1,2 : 5,8
Morphium	2,3 (1,76— 2,99)	2,3 (2,16— 2,43)	11,5 (10,55—12,54)	1 : 1 : 5,0
Hoechst 10 582	3,7 (3,24— 4,21)	5,8 (5,57— 6,03)	12,25 (11,0 —12,9)	1 : 1,6 : 3,3
Dolantin	5,8 (5,16— 6,49)	8,2 (7,32— 9,18)	12,3 (11,61—13,05)	1 : 1,4 : 2,1
Codein	10,8 (8,5 —13,71)	13,0 (11,6 —14,56)	48,5 (43,3 —54,32)	1 : 1,2 : 4,5
Paracodin	19,0 (16,9 —21,28)		80,0 (76,33—83,85)	1 : : 4,2
Dionin	23,8 (20,5— 27,6)		43,0 (34,96—52,9)	1 : : 1,8
			Durchschnittlicher Quotient	1 : 1,25 : 6,2

Tabelle 2. *Ergebnisse der Prüfung auf hustenhemmende Wirkung*
In den Spalten 2 und 3 sind die Arzneimitteldosen angegeben, welche bei 50% der Tiere den durch ein SO_2-Luftgemisch provozierten Husten verhüten. Die letzte Spalte zeigt das Dosisverhältnis zwischen beiden Tierarten

	Hustenhemmend wirkende ED_{50}		Quotient Ratte = 1
	Ratte	Meerschweinchen	
Eukodal	0,9 (0,79— 1,02)	0,43 (0,31— 0,58)	0,48
Polamidon	1,0 (0,81— 1,23)	1,06 (1,1 — 2,32)	1,1
Dicodid	1,33 (1,14— 1,54)	2,0 (1,42 — 2,8)	1,5
Cliradon	1,75 (1,41— 2,17)	2,3 (1,48— 3,56)	1,3
Morphium	3,0 (2,5 — 3,6)	4,0 (3,25— 4,92)	1,3
Hoechst 10582	7,0 (5,0 — 9,8)	4,6 (3,28— 6,44)	0,66
Dolantin	5,6 (4,14— 7,56)	8,0 (5,97—10,72)	1,4
Codein	10,0 (8,4 —11,9)	8,0 (6,1 —10,4)	0,8
Romilar	18,0 (13,3 —24,3)	14,0 (12,06—16,24)	0,78
Narkotin	16,0 (13,79—18,56)	18,5 (15,54—22,01)	1,2
	Durchschnittlicher Quotient = 1,1		

Schmerzreflexes erforderte durchschnittlich eine 1,7fach größere Arzneimittelmenge als die Reflexhemmung nach Wärmereizung; die Reihenfolge von den stark- zu den schwachwirksamen Stoffen (in der 2. und 3. Spalte der Tabelle) ist in beiden Fällen dieselbe.

Der Vergleich der Quotienten in der Tab. 3 mit denen der Tab. 1 zeigt, daß das Ergebnis der Arzneimitteltestung durch die Wahl der Versuchstierart gegebenenfalls in stärkerem Maße beeinflußt wird als durch die Wahl der Arbeitstechnik. Die erheblichen Abweichungen zwischen der Reaktionsweise im Analgesietest von Mäusen und Ratten einerseits und Meerschweinchen andererseits machen die große praktische

Tabelle 3. *Vergleich der schmerzverhütenden Arzneimitteldosen bei elektrischer bzw. Wärmereizung der Maus*
In der 2. und 3. senkrechten Spalte die bei 50% wirksamen Dosen mit den Grenzen für 95% Wahrscheinlichkeit, in der letzten Spalte das Dosisverhältnis bezogen auf das Ergebnis bei Wärmereizung (= 1)

Prüfstoff	Wärmereizung ED_{50} mg/kg	elektrische Reizung ED_{50} mg/kg	Quotient (Wärmereizung = 1)
Dilaudid	0,25 (0,19— 0,32)	0,53 (0,48—0,57)	2,12
Dromoran	0,37 (0,26— 0,51)	0,64 (0,51—0,8)	1,73
Eukodal	0,68 (0,59— 0,77)	1,3 (1,06—1,58)	1,91
Polamidon	1,4 (1,2 — 1,62)	1,35 (1,19—1,52)	0,96
Dicodid	1,6 (1,28— 2,0)	2,1 (1,77—2,47)	1,31
Morphium	2,3 (1,76— 2,99)	5,2 (4,48—6,03)	2,26
Dolantin	5,8 (5,16— 6,49)	—	—
Codein	10,8 (8,5 —13,71)	17,0 (15,04—19,21)	1,57
Pyramidon	90,0 (71,4—113,4)	172,0 (160,64—184,04)+	1,91
		Durchschnittlicher Quotient	1,72

+ = toxisch wirkende Dosis.

Tabelle 4. *Relative Wirksamkeit der Prüfstoffe im tierexperimentellen Analgesieversuch und nach klinischer Erfahrung*
In den senkrechten Spalten 2–5 wird das Dosisverhältnis auf Morphin = 1 bezogen angegeben. Die mit + versehenen Einzeldosen der Spalte 6 entsprechen den Angaben der Pharmacop. Int. Vol. I und II, ++ den Vorschlägen von KRAYER u. KIESE. Fett gedruckte Werte von Maus, Ratte und Meerschweinchen weichen in auffallender Weise von denen der klinischen Erfahrung ab

Prüfstoffe	Maus	Ratte	Meerschweinchen	Mensch	übliche Einzeldosis beim Menschen
Dilaudid	0,11 (0,083—0,14)	—	0,27 (0,21—0,34)	0,15 (0,1 —0,2)	0,001 - 0,002+
Dromoran	0,16 (0,11 —0,22)	—	**0,63 (0,56—0,72)**	0,2 (0,1 —0,3)	0,001 - 0,003++
Eukodal	0,3 (0,26 —0,33)	**0,21 (0,19—0,23)**	**0,18 (0,14—0,26)**	0,5	0,005+
Polamidon	0,61 (0,52 —0,7)	0,78 (0,67—0,91)	0,32 (0,26—0,4)	0,63 (0,25—1,0)	0,0025- 0,01+
Cliradon	**0,42 (0,35 —0,49)**	0,65 (0,6 – 0,71)	0,87 (0,72—1,04)	1,0 (0,5 —1,5)	0,005 - 0,015++
Morphinum	1	1	1	1	0,01+
Dolantin	2,52 (2,24 —2,82)	3,57 (3,18—3,99)	**1,07 (1,01—1,13)**	5 (3,3 —6,7)	0,05 —0,1+

Tabelle 5. *Relative Wirksamkeit der Prüfstoffe im tierexperimentellen Hustentest und nach klinischer Erfahrung*
In den senkrechten Spalten 2—4 wird das Dosisverhältnis auf Morphin = 1 bezogen angegeben. Die mit + versehenen Einzeldosen der Spalte 5 entsprechen den Angaben der Pharmacop. Int. Vol. I, ++ den Vorschlägen von KRAYER u. KIESE, +++ denen der Hersteller. ++++ wird im Text erläutert. Fett gedruckte Werte von Ratte und Meerschweinchen weichen in auffallender Weise von denen der klinischen Erfahrung ab

Prüfstoffe	Ratte	Meerschweinchen	Mensch	übliche Einzeldosis beim Menschen
Acedicon	—	0,63 (0,47—0,84)	0,42	0,0025++
Morphinum	1	1	1	0,006(=1/5 der Codeindosis)++++
Hoechst 10 582	2,33 (1,67—3,27)	1,15 (0,82—1,61)	1,47 (1,25—1,67)	0,0075—0,01+++
Dicodid	**0,44 (0,38—0,51)**	**0,5 (0,36—0,7)**	1,67 (0,83—2,5)	0,005 —0,015+
Romilar	**6 (4,43—8,1)**	3,5 (3,02—4,06)	2,08 (0,83—3,33)	0,005 —0,02+++
Dionin	—	3,25 (2,7 - 3,9)	2,5 (1,67—3,33)	0,01 —0,02++
Paracodin	—	3.5 (2,41—5,08)	3,33 (1,67—5,0)	0,01 —0,03++
Codein	3,33 (2,8 —4)	**2,0 (1,53—2,6)**	5,0	0,03+
Narkotin	5,33 (4,6 —6,19)	4,63 (3,89—5,5	6,33 (4,17—8,3)	0,025 —0,05+++

Bedeutung der artbedingten Einflüsse sehr deutlich. Man wird daher der Versuchstierspezies zumindest dieselbe Aufmerksamkeit widmen müssen wie den technischen Problemen der Testverfahren.

Hierbei verdienen folgende Gesichtspunkte besondere Beachtung:

1. Welcher Versuchstierart muß man im Hinblick auf die anzuwendende Arbeitstechnik den Vorzug geben?

2. Welche Versuchstierart besitzt Qualitäten, die ihr zur Prüfung der jeweiligen Versuchsstoffe eine hervorragende Eignung verleihen?

3. Welche Versuchstierart verdient auf Grund allgemeinerer Gesichtspunkte (Fleisch- oder Pflanzenfresser, Entwicklungshöhe des Zentralnervensystems u. a.) den Vorzug?

Für die Auswahl nach 1. kann aus den Versuchsergebnissen gefolgert werden, daß sich Mäuse und Ratten besser zur Analgesietestung eignen als Meerschweinchen, da sie generell wesentlich geringere Arzneimitteldosen benötigen. Zur Prüfung auf hustenhemmende Wirkung möchten wir Meerschweinchen vor Ratten den Vorzug geben. Bei beiden tritt zwar nach etwa gleich großen Dosen die Wirkung ein, aber beim Meerschweinchen läßt sich leichter erkennen, wann die Tiere husten (Reichle u. Friebel).

Für die Auswahl nach Punkt 2 ist letztlich entscheidend, ob die Schmerzreaktion bzw. der Hustenreflex der Versuchstierart durch die Prüfsubstanzen im gleichen Sinne verändert wird, wie der entsprechende Krankheitszustand beim Menschen. Welche Kleintierart dieser Forderung am besten entspricht, ist aus den Tab. 4 und 5 ersichtlich.

In ihnen ist angegeben, welche relative Wirksamkeit unsere Prüfstoffe im Vergleich zu Morphin für jede Tierart und für den Menschen besitzen. Die Dosisangaben für den Menschen entsprechen den „üblichen Einzeldosen" der Int. Pharmacopoe, Vol. I und II, ersatzweise Angaben von Krayer u. Kiese und notfalls Vorschlägen der Arzneimittelhersteller. Bei der Berechnung der relativen Wirksamkeit für die drei Tierarten wurden die in den Tab. 1—3 angegebenen ED_{50} für Morphin (unter Vernachlässigung der vertretbaren Grenzen für 95% Wahrscheinlichkeit) und die übrigen Stoffe zugrunde gelegt. Wir hielten den Verzicht auf die Grenzwerte von Morphin für vertretbar, weil einerseits das Berechnungsverfahren wesentlich vereinfacht wurde und andererseits bei den für den Menschen gültigen Dosisangaben überhaupt keine Fehlergrenzen genannt werden können.

In der Tab. 4 wird die *analgetische* Wirkung der Prüfstoffe berücksichtigt. Aus ihr geht hervor, daß alle 3 Tierarten Polamidon etwa der klinischen Erfahrung entsprechend einstuften. Geringere Übereinstimmung besteht bei Dromoran, Cliradon und Dolantin, die von einer Tierart, und beim Eukodal, das von zwei Tierarten anders eingestuft wurde, als es der therapeutischen Erfahrung entspricht. Im ganzen traten zwischen Meerschweinchen und Menschen gröbere Differenzen (Abweichungen um mehr als die Hälfte bzw. das Doppelte) häufiger auf als zwischen Mäusen bzw. Ratten und Menschen. So sind auch unter diesem Gesichtspunkt Mäuse und Ratten zur Analgesie-Prüfung wohl geeigneter als Meerschweinchen.

Demgegenüber zeigte sich bei der Prüfung auf *hustenhemmende* Wirkung (Tab. 5), daß die vom Meerschweinchen stammenden Werte ähnliche, vielleicht sogar etwas engere Beziehungen zur therapeutischen Erfahrung als die Rattenergebnisse haben. Erhebliche Differenzen zwischen Meerschweinchen und Mensch wurden bei Dicodid und Codein, zwischen Ratte und Mensch bei Dicodid und Romilar gefunden. Doch wird man nicht jede dieser Abweichungen den Versuchstieren zur Last legen können, denn über die therapeutische Anwendung neuerer Mittel wie Romilar (Lit. bei Friebel) liegen noch nicht so umfangreiche Erfahrungen vor, wie über die der älteren. Aber auch bei diesen bestehen bezüglich ihrer hustenhemmenden Wirkung beim Menschen insofern Unsicherheiten, als für sie, die sowohl analgetisch als auch hustenhemmend wirken, in der Regel nur *eine* „übliche Einzeldosis" angegeben wird, wobei offen bleibt, für welche Indikation sie zutreffend ist.

Diese offene Frage erschwert z. B. den Versuch, für Morphin eine mittlere hustenhemmende Einzeldosis anzugeben. Nach Eichholtz beträgt sie $^1/_5$ der Codeindosis. Eichholtz legt dem Quotienten 1 : 5 die Codeindosis 10—15 mg zugrunde, die Int. Pharmacopoe, deren Angaben von uns immer an 1. Stelle berücksichtigt wurden, nennt aber 30 mg als „übliche Einzeldosis". Für welche Indikation sowohl diese als auch die entsprechende Angabe für Dicodid zutrifft, bleibt unbeantwortet.

Diese Unsicherheiten seitens der Dosierung beim Menschen bedingen, daß in den Tab. 4 und 5 nur ein orientierender Überblick gegeben werden kann. Bindende Schlüsse auf die Eignung bestimmter Tierarten läßt er nicht zu.

Noch zurückhaltender wird man Angaben über die Vergleichbarkeit von tierexperimentellen Versuchsergebnissen mit Beobachtungen am Menschen aufnehmen müssen, die sich auf die Prüfung nur weniger Stoffe stützen (z. B. Angaben von Luckner u. Magun).

Für problematisch halten wir eine Auswahl von Versuchstieren nach allgemeinen Gesichtspunkten (Punkt 3). Das Beispiel der eigenen Versuche zeigt, daß sich eine generelle Bevorzugung von Ratten, etwa mit der Begründung, aufgrund ihrer Ernährungsweise hätten sie engere Beziehungen zum Menschen als Meerschweinchen, als unbegründet und unzweckmäßig erweisen muß, sobald man Analgetica auf hustenhemmende Wirkung prüft.

Nicht selten wird die Entwicklungshöhe des Zentralnervensystems als wichtiges Kriterium für die Eignung zur Analgesie-Prüfung angesehen. Zu dieser Frage können wir weder aus eigenen Erfahrungen noch aufgrund des Literaturstudiums Stellung nehmen, sondern nur auf die Angaben von Koll über die Brauchbarkeit des Hundes und den diesbezüglichen Diskussionsbeitrag von Fleisch u. Dolivo hinweisen.

Im ganzen wird die spezielle Analyse artbedingter Faktoren und die Anwendung ihrer Ergebnisse auf die Arzneimittelprüfung beitragen, Differenzen zwischen pharmakologischen Testergebnissen und klinischer Erfahrung einzuengen. Eine völlige Parallelität beider kann selbst in Zukunft nicht erwartet werden, — hieran hindern nicht nur die Unvollkommenheiten des Tierversuchs, sondern auch die Unmöglichkeit, aus der

therapeutischen Erfahrung heraus mathematisch gesicherte und begrenzte Vergleichswerte anzugeben. Doch geht aus den Tab. 4 und 5 deutlich hervor, mit wie großer Sicherheit die zur klinischen Prüfung geeigneten Verbindungen schon heute mit Hilfe von Kleintieren erkannt werden können.

Zusammenfassung

An Mäusen, Ratten und Meerschweinchen wurde der Einfluß artbedingter Eigentümlichkeiten auf das Ergebnis der Analgesie- bzw. Hustenschutztestung studiert. Der Schmerzreflex wurde mit dem Brennstrahl bzw. elektrischer Reizung, der Hustenreflex mit einem SO_2-Luftgemisch erzeugt. Als Versuchssubstanzen dienten 16 handelsübliche Analgetica und zentral hustenhemmende Stoffe. Sie wurden bei übereinstimmender Arbeitstechnik an verschiedenen Tierarten oder mit verschiedenen Methoden an derselben Tierart vergleichend geprüft. Die Ergebnisse zeigen, daß wenigstens zwei artbedingte Faktoren das Ergebnis der Arzneimittelprüfung beeinflussen.

Differenzen zwischen Testergebnissen, die durch diese *artbedingten Faktoren* hervorgerufen wurden, waren zum Teil erheblicher als solche, die durch einen *Wechsel der Arbeitstechnik* zustande kamen. Die Vergleichbarkeit der tierexperimentellen Testergebnisse mit der therapeutischen Erfahrung am Menschen war im großen und ganzen bei Ratten und Mäusen besser für den Analgesie-Test, bei Meerschweinchen für die hustenhemmende Wirkung.

Fräulein Christel Doll danken wir für ihre wertvolle Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Versuche.

Chemische Bezeichnungen der Prüfstoffe: Dicodid = Dihydrocodeinon hydrochl., Paracodin = Dihydrocodein bitartaric, Dilaudid = Dihydromorphinon hydrochl., Eukodal = Dihydrooxycodeinon hydrochl., Acedicon = Monoacetyldihydrocodeinon hydrochl., Dionin = Äthylmorphin hydrochl., Dolantin = 1-Methyl-4-phenyl-piperidin-4-karbonsäureäthylester als salzs. Salz, Cliradon = 1-Methyl-4-m-oxyphenyl-piperidin-4-äthylketon hydrochl., Polamidon = 2-Dimethylamino-4,4′-diphenyl-heptanon-(5) hydrochl., Hoechst 10582 = 1-Dimethylamino-3,3′-diphenyl-hexanon-(4) hydrochl., Dromoran = 3-Oxy-N-methylmorphinan tartar., Pyramidon = Dimethylaminophenyl-dimethylpyrazolon.

Literatur

Eichholtz, F.: Lehrbuch der Pharmakologie, 8. Aufl. Berlin: Springer 1955. — Fleisch, A., u. M. Dolivo: Helvet. physiol. Acta **11**, 305 (1953). — Friebel, H.: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 605. — Friebel, H., u. C. Reichle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 551 (1955). — Friebel, H., C. Reichle u. A. v. Graevenitz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 384 (1955). — Koll, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 83 (1952). — Luckner, H., u. R. Magun: Z. exper. Med. **117**, 133 (1951). — Reichle, C., u. H. Friebel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 558 (1955). — Trendelenburg, P., O. Krayer u. M. Kiese: Grundlagen der allgemeinen und speziellen Arzneiverordnung. Berlin: Springer 1952. — Wirth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 77 (1952).

Dozent Dr. Hans Friebel, Bonn, Reuterstr. 2b

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 408—418 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke) und der neurologisch-psychiatrischen Universitätsklinik Wien (Vorstand: Prof. Dr. H. Hoff)

EEG-Befunde bei Pseudoschmerzreflexen

Von

F. Brücke, H. Petsche, S. Sailer und Ch. Stumpf

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Mai 1956)

1930 hat Silver in einer Arbeit aus dem hiesigen Institut auf die gesteigerte Reaktionsfähigkeit von Kaninchen in leichter Barbituratnarkose auf schmerzhafte Reize hingewiesen und dieses Phänomen als „Pseudoschmerzreflex" bezeichnet. Der gleiche Autor hat auch eine Reihe von Substanzen auf ihre Wirkung auf den Pseudoschmerzreflex untersucht und vermutet, daß wirksame Pharmaka durch Erregung einer corticalen Hemmung die Reaktion des subthalamischen Pseudoschmerzzentrums auf Schmerzreize aufheben. Obwohl Zeichen einer Überempfindlichkeit gegenüber Schmerzreizen auch beim Menschen in leichter Barbituratnarkose auftreten, sind unseres Wissens seit der oben zitierten Arbeit keine Untersuchungen experimenteller Art über die medikamentöse Beeinflußbarkeit dieses Phänomens angestellt worden. In der vorliegenden Arbeit soll daher über Versuche berichtet werden, in denen neuerlich die Beeinflußbarkeit der Pseudoschmerzreflexe durch eine Reihe von Pharmaka unter Zuhilfenahme elektroencephalographischer Methoden untersucht wurde.

Methodik

Um möglichst gleichförmige Reaktionen zu erzielen, verwendeten wir als Versuchstiere Kaninchen von einheitlicher Größe (2,0—2,5 kg) und Rasse („Hamburger Fee").

Die Auslösung des Pseudoschmerzreflexes erfolgte mit Hilfe eines Francke-schen Schneppers, dessen Lanzette durch einen stumpf endenden Messingstab von 1,7 mm Durchmesser ersetzt war. Der Schnepper war an einer Schiene angebracht, auf welcher er in beliebigem Abstand von einer Bodenplatte fixiert werden konnte. Die Ausgangsposition wurde so gewählt, daß das Ende des Messingstabes beim vorgeschnellten Schnepper 0,8 mm von der Bodenplatte entfernt war. Erfahrungsgemäß löste am nicht narkotisierten Tier, dessen Ohr zwischen Bodenplatte und Schnepper gebracht wurde, bei dieser Einstellung der Druckreiz des vorschnellenden Schneppers keine motorische Reaktion aus.

Um nun Pseudoschmerzreflexe auslösen zu können, wurden die Tiere durch eine intravenöse Injektion von 30—35 mg/kg Evipan-Natrium (Bayer)[1] narkotisiert und die Narkosetiefe wurde fortlaufend am Verhalten der Stellreflexe bzw. des Cornealreflexes verfolgt. Vor und während der Narkose wurden wiederholt Schnepperreize gesetzt. Sollte die Beeinflussung durch Pharmaka untersucht werden, dann wurden diese entweder gleichzeitig oder bis zu 60 min vor der Evipaninjektion verabreicht. Von jeder Substanz wurden mindestens je zwei Dosen untersucht und für jede Dosis mindestens zwei Tiere verwendet.

Die EEG-Untersuchungen wurden nach der stereotaktischen Methode von Monnier u. Laue durchgeführt, deren Einzelheiten im Original nachgelesen werden müssen. Zur Registrierung wurde ein Ediswan Mark II — 8-Kanal-Tintenschreiber verwendet. Im wesentlichen besteht die genannte Methode in der Anbringung einer Plexiglasplatte (24 · 19 mm) am Kaninchenschädel, welche mit einem Netz von Durchbohrungen in 3 mm-Abständen versehen ist, durch welche die Ableitelektroden eingeführt werden können. Zur bipolaren Ableitung vom Cortex dienen Silberelektroden, die einzeln durch die Bohrungen eingeführt werden und extradural angelegt sind; die Ableitung erfolgt präcentral, parietal und von der Area striata. Außerdem wurden 6 in einem gemeinsamen Halter (nach Art der Hessschen Elektroden) montierte, bis auf eine 0,5 mm freie Spitze isolierte Silbernadelelektroden von gleicher Länge parasagittal in die Tiefe eingeführt und von verschiedenen Thalamusebenen fronto-occipital abgeleitet. Zur Registrierung des Reizes auf dem EEG-Papier wurde am Schnepper ein Kontakt angebracht, der durch das Vorschnellen des Messingstabes ausgelöst wurde und an einem hierfür reservierten Kanal des EEG-Gerätes den Moment des Reizes elektrisch registrierte. Um auch die motorische Reizbeantwortung zu registrieren, wurde am Kopf des Tieres eine Induktionsspule angebracht, über welcher in einem Stativ ein Permanentmagnet befestigt war. Bei Kopfbewegungen des Tieres entstanden Induktionsströme, deren Stärke der Größe der mechanischen Bewegung proportional war und mit dem gleichen Kanal des EEG-Gerätes registriert werden konnte wie der Reiz selbst. Für eine genaue Bestimmung des Reiz-Reaktions-Abstandes war allerdings die Tintenschreibung zu ungenau.

Ergebnisse

1. Pseudoschmerzreflex in der Evipannarkose. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe beziehen sich auf insgesamt 24 Einzelresultate (8 Versuchstiere, je 3 Versuche).

Unmittelbar nach der Evipaninjektion waren bei allen Versuchen Cornealreflex und Stellreflexe aufgehoben, Pseudoschmerzreflexe waren auf Schnepperreizung nicht nachweisbar. Mit abnehmender Narkosetiefe traten die einzelnen Reflexe zu den folgenden Zeitpunkten nach der Evipaninjektion wieder in Erscheinung:

Zeit bis zum Auftreten des Cornealreflexes	3,0 ± 0,4 min
Zeit bis zum Auftreten des vorderen Stellreflexes . . .	11,4 ± 0,7 min
Zeit bis zum Auftreten des hinteren Stellreflexes . . .	16,9 ± 1,1 min
Zeit bis zum Auftreten des Pseudoschmerzreflexes. . .	3,7 ± 0,4 min
Dauer der Nachweisbarkeit des Pseudoschmerzreflexes .	21,3 ± 3,6 min

[1] N-methyl-cyclohexenyl-methylbarbitursaures Na.

Die angegebenen Werte bedeuten die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler, die aus je 24 Einzelwerten berechnet wurden. Die einzelnen Tiere reagierten weitgehend einheitlich, so daß eine Zusammenfassung aller Einzelwerte gerechtfertigt ist.

Wie aus der obigen Zusammenstellung hervorgeht, tritt der Pseudoschmerzreflex nach Verabreichung von 30 mg/kg Evipan-Na i. v. praktisch zur gleichen Zeit wie der Cornealreflex in Erscheinung und bleibt mit abnehmender Narkosetiefe relativ lange Zeit erhalten; er ist im Durchschnitt erst 25 min nach der Evipaninjektion bzw. durchschnittlich 8,1 min nach dem Wiederauftreten des hinteren Stellreflexes nicht mehr nachweisbar. Unmittelbar nach seinem Auftreten besteht der Pseudoschmerzreflex nur in einem leichten Zucken des Kopfes. Etwa 5—10 min später ist er voll ausgeprägt; es kommt in diesem Stadium zu einer generalisierten motorischen Reaktion der gesamten Muskulatur. Im weiteren Verlauf des Versuches nimmt die Intensität der motorischen Reaktion des Pseudoschmerzreflexes im allgemeinen wieder ab.

2. Beeinflußbarkeit des Pseudoschmerzreflexes. In der nachfolgenden Tabelle sind die untersuchten Substanzen sowie deren Dosierung zusammengestellt; der Dosierung lag bei allen Substanzen eine geometrische Reihe mit dem Faktor 2 zugrunde. Als wirksam wurden jene Dosen bezeichnet, die den Pseudoschmerzreflex in allen Versuchen vollständig aufzuheben imstande waren, als partiell wirksam jene, bei denen diese Wirkung nur in einem Teil der Versuche beobachtet werden konnte. Bei den in der Tabelle als unwirksam bezeichneten Substanzen wurde die angegebene Dosis im allgemeinen wegen des Auftretens toxischer Symptome nicht weiter gesteigert.

Wie aus obiger Tabelle hervorgeht, finden sich Substanzen, die den Pseudoschmerzreflex aufheben, vor allem in der Gruppe der Phenanthrenderivate des Opiums bzw. der synthetischen Morphinersatzstoffe. Auffallend ist hierbei, daß Methadon ca. 10mal stärker wirksam war als Morphin und Meperidin, während 1-Piperidino-3,3-diphenyl-hexanon erst in subletalen Dosen eine partielle Wirksamkeit aufwies. Abgesehen von diesen Substanzen zeigten von den untersuchten Pharmaka nur Apomorphin und Largactil eine Wirkung auf den Pseudoschmerzreflex. Morphin (15 mg/kg), Meperidin (15 mg/kg), Methadon (3 mg/kg), Largactil (4 mg/kg), Scopolamin (5 mg/kg), Mesantoin (50 mg/kg) und Myanesin (50 mg/kg) bewirkten außerdem eine einwandfreie Verlängerung der Narkosedauer, gemessen am Zeitpunkt des Wiederauftretens des vorderen Stellreflexes.

3. Elektroencephalographische Untersuchungen[1]. Am nicht narkotisierten Tier löste die Schnepperreizung über der parietalen und striären

[1] Wir danken Herrn Ing. A. Marko für seine Mitarbeit bei den elektroencephalographischen Untersuchungen.

Rinde eine kurze Gruppe von Spitzen aus, deren Amplituden stark variierten und von der Phase der Grundtätigkeit, in die der Reiz fiel, abhängig zu sein schien. Gelegentlich waren überhaupt keine Veränderungen zu erkennen. Mit wesentlich konstanterer Amplitude und Form

Tabelle 1

Substanz und Applikationsart	Zeit der Applikation in min vor der Evipaninjektion	Dosis in mg/kg			
		Unwirksam	Partiell wirksam	Wirksam	Letal
Morphin. hydrochl., s.c.	30		15	30	
Codein. sulf., s. c. . . .	30		40		80
N-Methylphenyl-4-piperidincarbonsäure-äthylester (Meperidin), s. c. . . .	30			30	
4,4-Diphenyl-6-dimethylamino-3-heptanon (Methadon), s. c.	30			3	
1-Piperidino-3,3-diphenyl-hexanon, s. c.	30		12		24
p-Butylmercapto-benzhydryl-β-methyl-aminäthylsulfid (Covatin) i. v. . . .	4	12			24
10-(γ-dimethylaminopropyl)-2-chlorophenothiazin (Largactil), i. v.	15	2	4	8	
Apomorphin. hydrochl., s. c.	30			5	
Cardiazol, s. c.	60	25			
Coffein. natr. benz., s. c.	45	400			
Scopolamin. hydrobrom., i. v.	1	5			
Physostigmin. sulf., s. c.	8	0,5			
3-Methyl-5-phenyl-5-äthylhydantoin (Mesantoin), i. p. . .	60	50			
3-o-toloxy-1,2-propandiol (Myanesin), i. v.	1	50			100

konnten die positiven Spitzen im rückwärtigen oberen Thalamusanteil registriert werden, wo sie eine durchschnittliche Dauer von etwa 40 msec aufwiesen. Diese an der Rinde in unregelmäßigen Gruppen auftretenden Spitzen waren von einer Frequenzzunahme und Amplitudenabnahme gefolgt, wie sie für die „arousal reaction" charakteristisch sind. Bei oftmaliger, in kurzen Abständen (10—20 sec) wiederholter Schneppereizung trat insofern eine Gewöhnung ein, als mit zunehmender Zahl

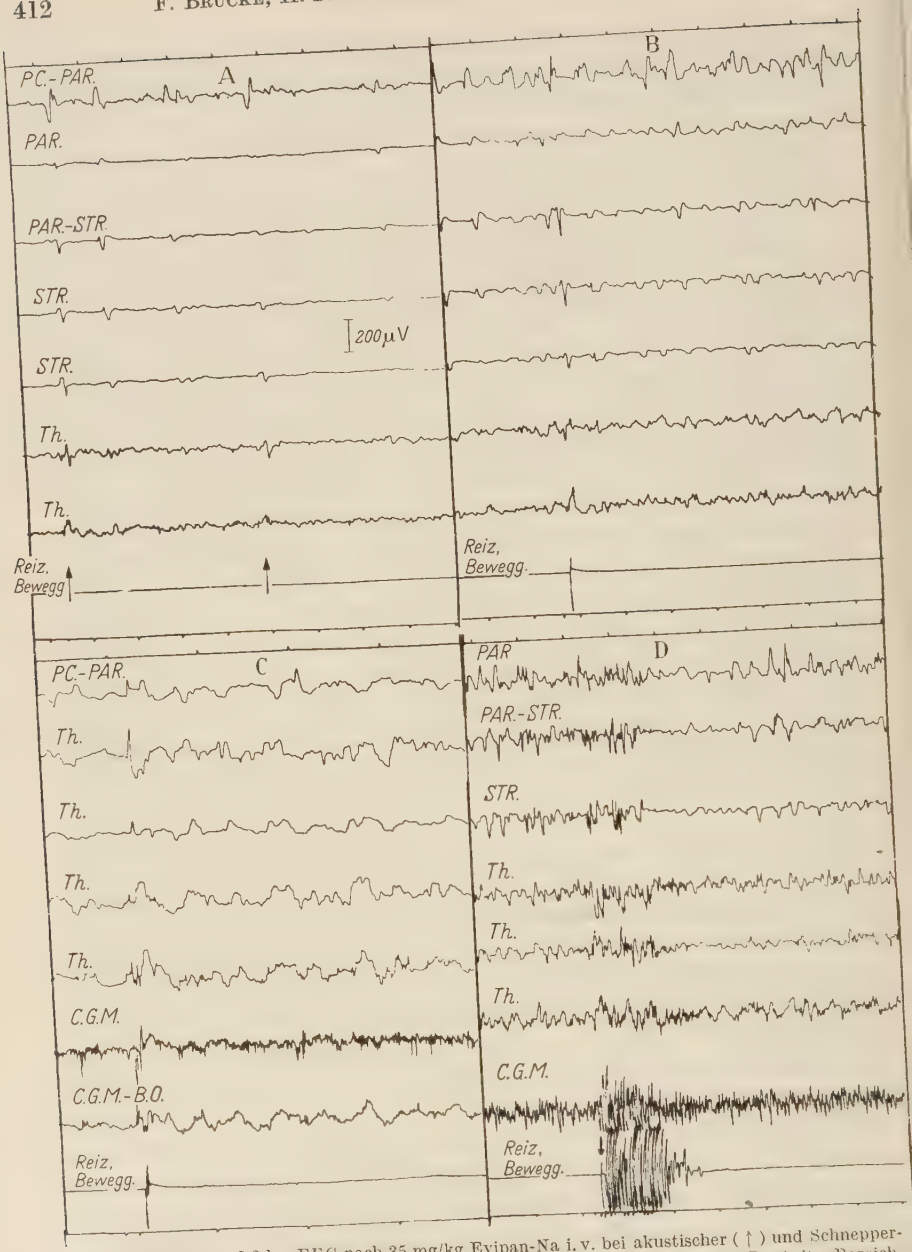


Abb. 1. Kaninchen, 2,3 kg. EEG nach 35 mg/kg Evipan-Na i. v. bei akustischer (↑) und Schnepperreizung (Markierung am untersten Kanal). Bipolare Ableitungen von der rechten Kopfseite. Bezeichnung: *PC* präzentrale Rinde, *PAR* patietale Rinde, *STR* striäre Rinde, *Th* unterste Thalamusebene, parasagittal von oben nach unten fronto-occipital, *CGM* Corpus geniculatum mediale. Zeitschreibung: 1 sec Ableitungen in A und B gleich, sonst wie angegeben. Unterster Kanal: Reiz- und Bewegungsregistrierung. *A*: 30 sec nach Evipan. *B*: 2 min nach Evipan. *C*: 3 min nach Evipan. *D*: $4^3/_4$ min nach Evipan (erster Pseudoschmerzreflex)

der Reize eine „arousal reaction" schließlich nicht mehr auslösbar war. Eine motorische Reaktion auf Schnepperreiz trat niemals in Erscheinung.

Die Verabreichung von 30—35 mg/kg Evipan-Natrium führte unmittelbar nach der Injektion zu einem tiefen Schlaf, der im EEG durch eine flache Kurve mit Gruppen synchroner, langsamer, hoher Wellen („spindle bursts") charakterisiert war. In diesem Stadium bewirkte Schnepperreizung oder akustische Reizung (Hände klatschen) keine motorische Reaktion, vermochte jedoch derartige Gruppen im EEG auszulösen (Abb. 1 A u. B). Mit abnehmender Narkosetiefe wurden die Intervalle zwischen den einzelnen „spindle bursts" immer kürzer und es prädominierte schließlich eine synchrone Tätigkeit von durchschnittlich 6 Hz mit Amplituden bis zu 800 μV, die die Basis völlig deckte. In diesem Stadium verursachte Schnepperreizung eine schwache „arousal reaction", die durch eine Gruppe von „evoked potentials" eingeleitet wurde (Abb. 1 C); diese zeigten eine höhere Amplitude als am nicht narkotisierten Tier und ließen eine deutliche langsame Nachschwankung erkennen. Erst einige Zeit nachdem diese Erscheinungen eingetreten waren, kam es nunmehr auf Schnepperreiz zum Auftreten des typischen Pseudoschmerzreflexes (Abb. 1 D), dessen Latenz und Dauer stark variierte. Während der motorischen Tätigkeit kam es über der gesamten abgeleiteten Rinde, am deutlichsten jedoch über der parietalen und striären Region, zu einer Zunahme der β-Frequenz und der Spitzen und einer darauffolgenden, 1—2 sec dauernden „arousal reaction", die über der rückwärtigen parietalen und striären Rinde am deutlichsten ausgeprägt war. Je mehr Myoklonismen auftraten, um so höher und zahlreicher waren die Spitzen. In einem Versuch, bei dem während des Stadiums der Pseudoschmerzreflexe die Muskulatur durch 300 γ/kg Succinyl-bischolin i. v. nahezu komplett gelähmt wurde, waren auch im EEG nach Schnepperreizung parallel mit der Verkürzung der Myoklonismen die genannten Erscheinungen entsprechend abgekürzt.

Largactil bewirkte in einer Dosierung von 4 mg/kg i. v. bereits 3 min nach der Injektion eine deutliche Verlangsamung der Grundtätigkeit über der gesamten abgeleiteten Rinde auf 2—3 Hz, wobei auch die frontalen, raschen hohen Wellengruppen (im 12 Hz-Bereich) unterdrückt wurden. Gleichzeitig nahmen die Amplituden beträchtlich zu. Als Besonderheit ist zu erwähnen, daß wir im Corpus geniculatum mediale wiederholt ebenfalls eine Abnahme der hohen β-Frequenzen bis ins 9 Hz-Bereich (mit Verlangsamung bis 6 Hz) beobachten konnten; diese Tätigkeit wurde durch akustische Reize im Gegensatz zum Verhalten des nicht vorbehandelten Tieres gehemmt, verhält sich also wie der Grundrhythmus und zeigte eine lokale „arousal reaction". Auf Schnepperreizung traten immer „evoked potentials", jedoch nur selten eine angedeutete „arousal reaction" auf. Die nach Verabreichung von Evipan (15 min

nach Largactil) registrierte Schlafkurve zeigte keine wesentliche Änderung gegenüber dem entsprechenden Kurvenverlauf nach Verabreichung von Evipan allein. Auf Schnepperreizung traten „evoked potentials" auf. Mit abnehmender Schlaftiefe führte Schnepperreizung gelegentlich zu Pseudoschmerzreflexen, die im EEG mit einer „arousal reaction" vergesellschaftet waren (Abb. 2). Löste die Schnepperreizung keine motorische Reaktion aus, dann fehlte auch im EEG die „arousal reaction".

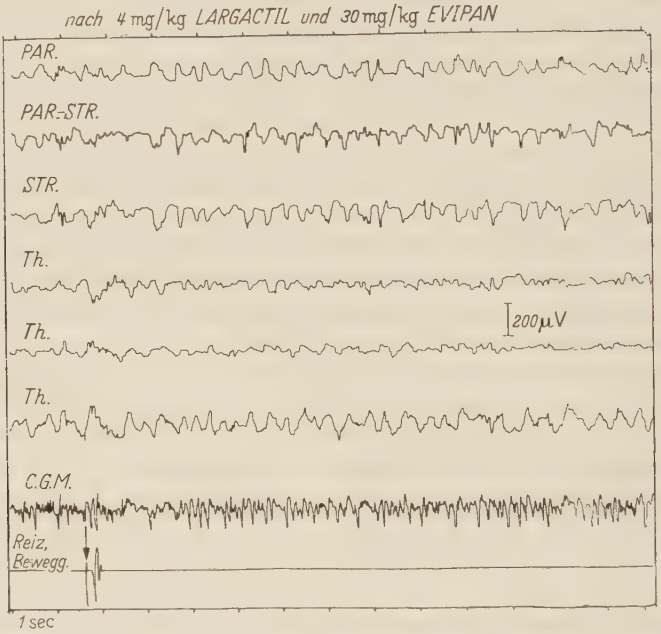


Abb. 2. Kaninchen, 2,1 kg. EEG 33 min nach Largactil und 16 min nach Evipan. Bezeichnung der Ableitungen wie in Abb. 1. Schwacher Pseudoschmerzreflex nach Schnepperreizung

Morphin (30 mg/kg s. c.) führte 5 min post inj. zu einer deutlichen Verlangsamung und Amplitudenzunahme der gesamten cerebralen Tätigkeit; die frontalen raschen Gruppen wurden jedoch nicht so stark unterdrückt wie durch Largactil. Nach zusätzlicher Verabreichung von Evipan (30 min nach Morphin) zeigte sich im EEG die typische Evipan-Schlafkurve; durch Schnepperreizung waren „evoked potentials" auslösbar, während Pseudoschmerzreflexe bzw. „arousal reaction" nicht auftraten.

Nach 5 mg/kg *Apomorphin* s. c. zeigte sich im EEG eine starke Verflachung und Frequenzzunahme, wodurch die Kurve das Bild einer Dauer-„arousal reaction" darbot. Auf weitere Einzelheiten der EEG-Veränderungen unter Apomorphineinwirkung soll in einer eigenen Arbeit näher eingegangen werden. Zusätzliche Verabreichung von Evipan führte rasch zum Stadium der „spindle bursts". Der Evipan-Schlaf unter

Apomorphin unterscheidet sich jedoch deutlich vom Schlaf unter Evipan allein: er wies geringere Amplituden, weniger Spitzen und eine regelmäßigere Tätigkeit im 8 Hz-Bereich auf. Das langsame Theta-Delta-Stadium fehlte fast überhaupt. Wie unter Morphin + Evipan sind durch Schnepperreize „evoked potentials", jedoch keine Pseudoschmerzreflexe und „arousal reactions" auslösbar.

Diskussion

Die als Pseudoschmerzreflexe bezeichnete Erscheinung manifestierte sich in unseren Untersuchungen als eine auf einzelne Körperteile beschränkte oder generalisierte motorische Reaktion, die in bestimmten Stadien der Evipannarkose durch taktile und schmerzhafte, normalerweise reaktionslos ertragene Reize ausgelöst werden kann. Der Pseudoschmerzreflex ist vom Zeitpunkt des Wiederauftretens des Cornealreflexes bis zu einem Zeitpunkt, zu dem das Tier sich aus der Seitenlage bereits wieder selbständig aufrichtet, nachweisbar. Wie die Untersuchungen von Silver zeigen, handelt es sich hierbei um keine spezifische Evipanwirkung, da auch in der durch Chloralose, Paraldehyd, Luminal, Veronal und Veramon bewirkten Narkose eine derartige Überempfindlichkeit besteht.

Unsere elektroencephalographischen Untersuchungen ließen zunächst die bereits seit langem bekannte Tatsache erkennen, daß in der Barbituratnarkose das Auftreten von corticalen Reaktionen auf periphere Reize begünstigt ist. Diese Beobachtung wurde bereits in einer der ersten Arbeiten über die Wirkung von Narkoticis auf das EEG beschrieben (Derbyshire et al.). Im Stadium der langsamen hohen Wellen führte Schnepperreizung zum aufeinanderfolgenden Auftreten (a) einer nach Dempsey, Morison u. Morison über die klassischen sensiblen Bahnen geleiteten und nach Eccles lokalisiert nachweisbaren primären Reaktion, (b) einer nach Morison u. Dempsey über das diffuse thalamo-corticale (intralaminäre) System geleiteten und über weite Hirnregionen nachweisbaren langsamen Nachschwankung (von Forbes u. Morison an der Katze als „secondary response" bezeichnet) und schließlich (c) einer nach Moruzzi u. Magoun durch das ascendierende reticuläre System vermittelten „arousal reaction". Hierbei war die primäre Reaktion abgeschwächt, die sekundäre hingegen erheblich verstärkt. Nach Brazier nimmt tatsächlich unter zunehmender Narkosetiefe die primäre Reaktion um 30% ab, die sekundäre jedoch um 100% zu. Darüber hinaus war in unseren Versuchen die nach Schnepperreizung in Evipannarkose auftretende „arousal reaction" im Vergleich zu der entsprechenden Reaktion des nicht narkotisierten Tieres erheblich abgekürzt.

In diesem Zusammenhang sind die von anderen Autoren beobachteten Wirkungen der Barbiturate auf die beiden diffusen nicht spezifischen

Projektionssysteme von Interesse. Barbiturate hemmen das ascendierende reticuläre System (French et al., Arduini et al., Domino); andererseits wird die über das intralaminäre thalamische System geleitete „recruiting response" nicht nur nicht gehemmt (Morison u. Dempsey; Jasper et al.) sondern sogar verstärkt (Domino). Domino nimmt an, daß dieser Effekt weniger einer direkten Erregung des diffusen thalamischen Projektionssystems, sondern eher der Hemmung der reticulären Mittelhirnformation zuzuschreiben ist, so daß die Verstärkung der sekundären Reaktion als ein Enthemmungsphänomen aufzufassen wäre.

Interessanterweise trat nun in einem ganz bestimmten Stadium der Narkose bei nociceptiver Reizung eine Irradiation auf motorische Systeme ein; dieser Vorgang geht offenbar nicht über den Cortex, da Silver zeigen konnte, daß Pseudoschmerzreflexe auch am decortizierten Kaninchen in Pernoctonnarkose auslösbar sind. Trat in unseren Untersuchungen auf Schnepperreiz ein Pseudoschmerzreflex auf, so war in den corticalen Ableitungen regelmäßig neben den beschriebenen Erscheinungen auch das Auftreten hoher Frequenzen und Spitzen zu beobachten. Da nach neuromuskulärer Blockierung der Erregungsüberleitung durch Succinylbis-cholin Frequenzzunahme im EEG und motorische Reaktion gleichsinnig verkürzt waren, müssen die genannten EEG-Erscheinungen als repetitiv durch proprioceptive Reize ausgelöste Potentiale angesehen werden.

Nach Silver sind Morphin, Codein, Eucodal, Apomorphin, aber auch Coffein, Cardiazol und Euphyllin imstande, die Pseudoschmerzreflexe am narkotisierten Kaninchen aufzuheben. Unsere Versuchsergebnisse stimmen mit den Befunden des genannten Autors insofern nicht überein, als wir eine derartige Wirkung für Coffein und Cardiazol nicht nachweisen konnten (Euphyllin wurde von uns nicht untersucht). Die Wirksamkeit von Morphin, Codein und Apomorphin konnte hingegen bestätigt werden. Möglicherweise können die Unterschiede in den beiden Befunden durch die Verwendung verschiedener Narkotica — Silver verwendete das wesentlich länger wirkende Pernocton — erklärt werden. Weitere Substanzen, die die Überempfindlichkeit narkotisierter Kaninchen aufheben, sind — wie wir zeigen konnten — die synthetischen Morphin-Ersatzpräparate Meperidin und Methadon, sowie Largactil. Am wirksamsten waren Methadon (wirksame Dosis: 3 mg/kg) und Apomorphin (wirksame Dosis: 5 mg/kg).

Die von uns nach Verabreichung von Largactil beobachteten EEG-Veränderungen sind gut bekannt, wobei insbesondere die Hemmung der reticulären Mittelhirninformation bzw. der „arousal reaction" als primäre Wirkung dieser Substanz bezeichnet wird (Terzian; Terzian et al.; Hiebel et al.; Longo et al.). Zusätzlich konnten wir feststellen, daß unter Largactil die elektrische Tätigkeit im Corpus geniculatum

mediale auf akustische Reize die Charakteristica einer lokalisierten „arousal reaction" zeigt. Übereinstimmend mit Hippius et al. blieb auch in unseren Versuchen die Evipan-Schlafkurve durch Vorbehandlung mit Largactil unbeeinflußt. Ähnlich wie Largactil führte auch Morphin zu einer Frequenzabnahme und Amplitudenzunahme (vgl. Toman u. Davis). Prinzipiell andersartig wirkte das den Pseudoschmerzreflex ebenfalls beeinflussende Apomorphin. Diese Substanz bewirkte in einer Dosierung von 5 mg/kg eine von uns als „Dauer-arousal reaction" bezeichnete Frequenzzunahme und Amplitudenabnahme über eine Zeit von 2—3 Std in allen corticalen Ableitungen, wobei auch die Evipan-Schlafkurve deutlich verändert war.

Gemeinsam war allen drei genannten Substanzen, daß nach Schnepperreizung unter der Wirkung von nachfolgend gegebenen Evipan wohl ausgelöste Potentiale, jedoch keine „arousal reaction" auftraten. Unter Largactil waren die ausgelösten Potentiale nach Schnepperreizung sogar stärker ausgeprägt als nach Schnepperreizung in Evipannarkose ohne Vorbehandlung. In gleicher Weise wie die „arousal reactions" waren unter der Wirkung der genannten Substanzen auch die Pseudoschmerzreflexe aufgehoben. Daß in der Hemmung der reticulären Mittelhirnformation jedoch nicht der gemeinsame Wirkungsmechanismus der drei untersuchten Substanzen zu suchen sein kann, geht z. B. schon daraus hervor, daß einerseits Apomorphin selbst eine „arousal reaction" auslöst, andererseits Scopolamin nach Longo et al. am Kaninchen die „arousal reaction" bereits in Dosen unterdrückt, die erheblich kleiner sind als jene, die in unseren Versuchen auf den Pseudoschmerzreflex keinerlei Wirkung hatten. Wenn auch anzunehmen ist, daß die Beeinflussung des Pseudoschmerzreflexes durch Apomorphin auf prinzipiell andere Weise zustandekommt als die durch Morphin und Largactil, so soll doch darauf hingewiesen werden, daß Apomorphin in mancher Hinsicht ähnliche Wirkungen wie Morphin entfaltet. So soll z. B. Apomorphin in üblicher Dosierung beim Menschen gelegentlich kein Erbrechen auslösen, sondern eine zentral dämpfende Wirkung entfalten (Goodman u. Gilman). Diese Wirkung kommt vielleicht auch darin zum Ausdruck, daß in unseren Versuchen nach Evipaninjektion die Schlafspindeln im EEG schneller auftraten, wenn die Tiere mit Apomorphin vorbehandelt waren.

Zusammenfassung

An Kaninchen in Evipannarkose kann in bestimmten Stadien der Narkose durch nociceptive Reizung, die normalerweise reaktionslos ertragen wird, eine motorische Reaktion (Pseudoschmerzreflex) ausgelöst werden. Morphin, verschiedene Morphinderivate und synthetische Morphin-Ersatzmittel, sowie Apomorphin und Largactil sind imstande,

diese Überempfindlichkeit aufzuheben. Die während des Pseudoschmerzreflexes auftretenden EEG-Veränderungen, sowie ihre Beeinflussung durch Morphin, Apomorphin und Largactil werden beschrieben und diskutiert.

Literatur

Arduini, A., and M. G. Arduini: J. of Pharmacol. **110**, 76 (1954). — Brazier, A. B.: Brain Mechanism and Concsiousness. p. 163—193. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1954. — Dempsey, E. W., R. S. Morison and B. R. Morison: Amer. J. Physiol. **131**, 718 (1941). - Derbyshire, A. J., B. Rempel, A. Forbes and E. F. Lambert: Amer. J. Physiol. **116**, 577 (1936). — Domino, E. F.: J. of Pharmacol. **115**, 449 (1955). — Eccles, J. C.: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **3**, 449 (1951). — Forbes, A., and B. R. Morison: J. of Neurophysiol. **2**, 112 (1939). — French, J. D., M. Verzeano and H. W. Magoun: Arch. of Neur. **69**, 505, 519 (1953). — Goodman, L. S., and A. Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics, second edition. New York: The Macmillan Company 1955. — Hiebel, G., M. Bonvallet et P. Dell: La Semaine des Hôspitaux de Paris, 30e année, n0 37, 6, juin 1954. — Hippius, H., P. Mellin u. L. Rosenkötter: Z. exper. Med. **125**, 128 (1955). — Jasper, H., R. Naquet and E. E. King: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **7**, 99 (1955). — King, E.: Federat. Proc. **13**, 375 (1954). — Longo, V. G.: J. of Pharmacol. **116**, 198 (1956). — Longo, V. G., G. P. von Berger and D. Bovet: J. of Pharmacol. **111**, 439 (1954). — Monnier, M., u. H. Laue: Helvet. physiol. Acta **11**, 73 (1953). — Morison, R. S., and E. W. Dempsey: Amer. J. Physiol. **135**, 281 (1942). — Moruzzi, G., and H. W. Magoun: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **1**, 445 (1949). — Silver, S.: Pflügers Arch. **158**, 219 (1930). -- Terzian, H.: Rass. Neur. veget. **9**, 211 (1952). — Terzian, H., e R. Ruberti: Riv. Neur. **24**, 686 (1954).

Prof. Dr. F. Brücke, Wien/Österreich, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 419—431 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Kontraktionsverlauf und Kaliumfreisetzung durch Acetylcholin an der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur bei verschiedenen Calciumkonzentrationen

Von

O. Kraupp, H. Stormann, B. Pillat und P. H. Clodi

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Juni 1956)

In vorangegangenen Mitteilungen[13, 14, 15] wurde über eine Freisetzung von Kaliumionen aus der innervierten und chronisch denervierten Muskulatur der isoliert durchströmten hinteren Katzenextremität nach intraarteriellen Acetylcholininjektionen unter verschiedenen Durchströmungsbedingungen berichtet. Als anatomischer Ort der Kaliumfreisetzung wurde auf Grund der erhaltenen Befunde die Endplattenregion des quergestreiften Muskels angenommen, wobei jedoch besonders an der denervierten Muskulatur infolge der gleichzeitig stattfindenden Kontraktur die Möglichkeit einer Kaliumfreisetzung aus den übrigen Teilen der Muskelfaser nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Für ein weiteres Studium der Frage des Ortes der Kaliumfreisetzung war nach Versuchsbedingungen zu suchen, unter denen die Empfindlichkeit der Endplatte gegenüber Acetylcholin weitgehend unverändert bleibt, die Weiterleitung der Endplattendepolarisation auf die übrige Muskelfaser jedoch eingreifend verändert wird. Solche Versuchsbedingungen schienen uns in Änderungen der Calciumionenkonzentration der Durchströmungsflüssigkeit gegeben zu sein, da aus elektrophysiologischen Untersuchungen bekannt war, daß innerhalb 0—10 mM/l Calcium die Höhe des durch ACh-Auftropfung hervorgerufenen Endplattenpotentials im wesentlichen unverändert bleibt, die Erregungsweiterleitung auf die übrige Faser und damit die mechanische Antwort jedoch weitgehende Veränderungen erfährt (Brink[1]). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der extracellulären Calciumkonzentration auf die nach ACh auftretenden Spannungsänderungen der Muskulatur sowie auf die gleichzeitig erfolgende Kaliumfreisetzung untersucht.

Methodik

Die Versuche wurden an Katzen im Gewicht von 2,2—3 kg durchgeführt, bei denen jeweils 8—14 Tage vorher eine Extremität durch Durchschneidung der Nn. ischiadicus und femoralis denerviert worden war. Die Tiere wurden in Chloralosenarkose (80 mg/kg) eviszeriert (gesamter Magen-Darmtrakt, inneres weibl. Genitale, Milz und Nieren) und anschließend beidseitig Art. und V. iliaca freipräpariert. Beckenäste sowie Arteria caudalis wurden sorgfältig unterbunden. Beide Achillessehnen wurden freipräpariert, durchschnitten und an den zentralen Stümpfen 0,3 mm dicke Stahlseile (Fischereivorfächer) befestigt. Die Tiere wurde auf einer schiefen Ebene aufgebunden, wobei beide hinteren Extremitäten an den distalen Femurkondylen beidseitig durch spitz zulaufende Klemmschrauben befestigt wurden. Nun wurden beide Venae iliacae kanüliert und von der Aorta aus die hinteren Extremitäten mit einer Katzenblut-Tyrodelösung (1:5) (Zusammensetzung der Tyrodelösung siehe[13]) durchströmt. Anschließend wurde mit einem Heymanschen Ekraseur die untere Tierhälfte in der Höhe der Lendenwirbelsäule vom oberen Tier abgetrennt. Gleichzeitig wurden die Stahlseile von der Achillessehne über eine Rolle an isometrischen Muskelschreibern befestigt. Die ganze untere Tierhälfte wurde außerdem in ein Wasserbad von 36° C versenkt.

Die Muskelregistrierung erfolgte in der einen Hälfte der Versuche mittels isometrischem Stahlfederschreiber und Rußkurvenregistrierung; in der anderen Hälfte der Versuche durch Registrierung mittels Dehnungsmeßstreifen (Philips Type GM 4472), die auf einer Messingmembran von 0,3 mm Dicke und einem Durchmesser von 60 mm aufgeklebt waren. Die Widerstandsänderungen des Dehnungsmeßstreifens wurden der Meßbrücke eines Strain Gage Amplifiers (Sanborn Co., Type 64—500 A) zugeführt und mittels eines Sanborn-Twin-Viso-Direktschreibers (Type 60—1300) fortlaufend registriert. In allen Versuchen wurde nach Kalibrierung des Gerätes an die Mm. Gastrocnemii beider Extremitäten eine Ruhebelastung von 100—150 g angelegt.

Der venöse Ausfluß aus beiden Beckenvenen wurde getrennt in Zweiminuten-Perioden gesammelt, das Durchflußvolumen gemessen, sofort abzentrifugiert und in der überstehenden Flüssigkeit nach Verdünnung 1:11 der Kaliumgehalt mittels eines Beckman-Flammenphotometers gemessen. Ebenso wurde der Kaliumgehalt der einströmenden Flüssigkeit laufend kontrolliert.

Zur Berechnung der nach den einzelnen intraarteriellen ACh-Injektionen zusätzlich aus der Muskulatur in Freiheit gesetzten Kaliummengen wurden zunächst die Differenzen zwischen den Kaliumausflußkonzentrationen in den Sammelperioden unmittelbar nach der ACh-Injektion und den entsprechenden Konzentrationswerten in den Kontrollperioden vor bzw. 10—20 min lang nach der Injektion bestimmt. Diese Differenzen wurden mit den Durchflußvolumina der dazugehörigen Sammelperioden multipliziert und die so erhaltenen Produkte aller Sammelperioden mit erhöhter Kaliumausflußkonzentration zusammengezählt. Die auf diese Weise erhaltenen Werte sind in den Dosis-Wirkungskurven der Abb. 6 angegeben.

Die Calciumkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit wurde komplexometrisch gemessen. (10 cm^3 des Zentrifugates wurden mit 40%iger Natronlauge auf p_H 12—13 gebracht und nach Zusatz von frisch zubereiteter gesättigter wäßriger Murexidlösung bis zur kräftigen Rotfärbung mit 0,02 M Komplexon bis zum Farbumschlag nach Blauviolett titriert. Die in den einzelnen Versuchen jeweils erwünschten Calciumkonzentrationen wurden durch entsprechenden Zusatz von Calciumchlorid oder der entsprechenden Menge Komplexon (zur Erreichung von 0,5 und 0 mM/l Ca) hergestellt.

Die Injektion von ACh (Bromid) erfolgte in den zuführenden Schlauch unmittelbar vor der Aortenkanüle. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Dosen 1 cm^3

(innerhalb 1 sec injiziert). Da sich die in die Aorta injizierten ACh-Gesamtdosen im Verhältnis der Durchflußgrößen auf die beiden Extremitäten aufteilten, wurden die pro Extremität verabreichten ACh-Dosen aus der Gesamtdosis und dem Durchflußverhältnis errechnet.

Insgesamt wurden 20 Durchströmungsversuche durchgeführt.

Versuchsergebnisse

I. Versuche bei normaler Calciumkonzentration (2 mM/l)

a) Kaliumfreisetzung und Spannungsänderungen nach ACh-Verabreichung am innervierten Muskel. Die nach Dosen von über 1 μM ACh in Erscheinung tretende zusätzliche Kaliumausschüttung lag in derselben

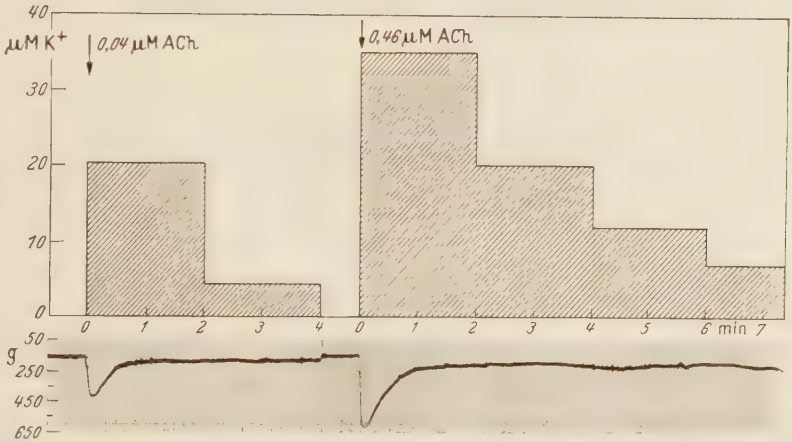


Abb. 1. Spannungsverlauf (untere Kurven) und Kaliumfreisetzung in μM an der denervierten hinteren Katzenextremität nach zwei verschiedenen ACh-Dosen. Abszisse (beiden gemeinsam): Zeit in Minuten nach der ACh-Injektion. Durchströmung mit 2,0 mM/l Ca^{++}

Größenordnung wie in gleichlaufend durchgeführten früheren Versuchen (vgl. Abb. 5, III. Kurve, Kreuze mit Geraden NI aus[13]).

Spannungsänderungen in Form von kurzdauernden Kontrakturen konnten wir nur in zwei Versuchen nach Verabreichung von 20 μM ACh beobachten. Somit sind an der isolierten Durchströmungsanordnung bei Verwendung von Blut-Verdünnungen weit höhere Dosen von ACh zur Erzielung von Spannungsänderungen notwendig als am intakten Ganztier bei intravenöser Zufuhr (etwa 5 μM, Simmonart u. Simmonart[20]) oder bei naher arterieller Injektion (Brown[2]).

Ein Vergleich der ACh-Grenzdosen für Kaliumfreisetzung und Spannungszunahme an der innervierten Extremität ergibt, daß an der isolierten Durchströmungsanordnung die Kontraktur erst bei etwa 10fach höheren ACh-Dosen in Erscheinung tritt als die Kaliumfreisetzung.

b) Kaliumfreisetzung und Spannungsänderungen nach ACh Verabreichung am chronisch denervierten Muskel. Die Dosis-Wirkungskurve

der Kaliumfreisetzung zeigte wieder denselben Verlauf wie in früheren Untersuchungen[13], (siehe auch Abb. 5, Kurve III, Punkte). In Gegensatz zum Verhalten der innervierten Muskulatur lagen an der denervierten Muskulatur die Schwellendosen für Kaliumfreisetzung und Kontraktur im selben Bereich (0,01 μM, = etwa 2 μg). Abb. 1 gibt den Kontrakturverlauf, zusammen mit der Größe und dem zeitlichen Ablauf der Kaliumfreisetzung nach zwei verschiedenen ACh-Dosen in synchroner Darstellung wieder. Wie aus Abb. 1 ersichtlich und noch in mehreren anderen Versuchen bestätigt werden konnte, zeigten die im Dosenbereich von

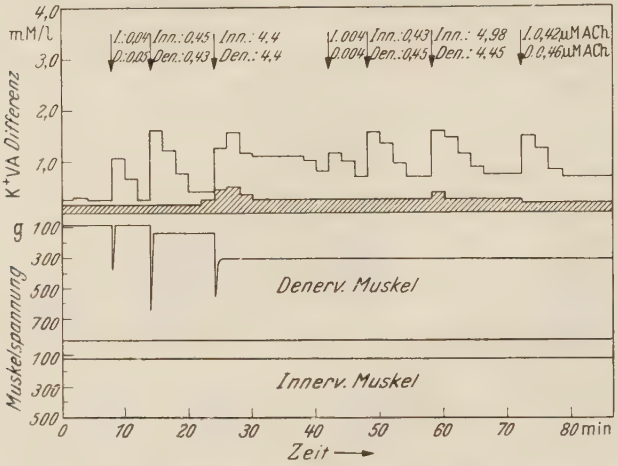


Abb. 2. VA-Differenzen der Kaliumionen sowie Spannung des M. gastrocnemius einer innervierten sowie kontralateralen chronisch denervierten hinteren Katzenextremität bei normaler Ca-Durchströmung (2,0 mM/l): *Obere Kurve*: schraffierte Felder: Innerv. Muskel; leer umrandete Felder: Denerv. Muskel. Ord.: Kalium VA Diff. in mM/l. *Mittl. Kurve*: Ordinate: Spannungsverlauf denerv. Muskel bei isom. Reg. *Unt. Kurve*: Spannungsverlauf innerv. Muskel. Abszisse (allen drei Kurven gemeinsam): Zeit in Minuten, Pfeile: intraarterielle ACh-Injektionen

0,01—2,0 μM ACh entwickelten maximalen Spannungen eine klare Dosisabhängigkeit und erreichten je nach der Dosis 50—600 g. Die bei naher arterieller Injektion am Ganztier beobachtete Zuckungsphase (Brown[3]) war in unseren Versuchen in der Regel nur durch einen Absatz in der ansteigenden Phase der Kontraktur angedeutet zu erkennen (Abb. 1), bei einem Teil der Versuche, besonders bei höheren Dosen fehlte sie ganz. Die nach Dosen von 0,01 μM—2,0 μM auftretenden Kontrakturen waren in der Mehrzahl der Versuche völlig reversibel, in einigen Fällen blieben jedoch geringe Restspannungen für längere Zeit bestehen (siehe auch 2. Kontraktur in Abb. 1). Bei höheren ACh-Dosen (über 2,0 μM) kehrte die Spannung nur in einzelnen Fällen wieder auf ihren Ausgangswert zurück, in der Mehrzahl blieb jedoch eine beträchtliche Restspannung bestehen, die dann meist auch von einer dauernden Erhöhung der Kaliumausflußkonzentration begleitet war (Abb. 2). Die

Neigung zur Restspannungsbildung nahm überdies mit fortschreitender Versuchsdauer zu.

Es war nun von großem Interesse zu beobachten, daß in vielen Versuchen bei Auftreten stärkerer Restspannungen die Kontrakturfähigkeit auf ACh völlig erloschen war, obwohl der Muskel zur gleichen Zeit noch mit einer unveränderten Kaliummehrausschüttung reagierte (Abb. 2). Es kann dies nur so gedeutet werden, daß der der Kaliumfreisetzung zugrunde liegende Mechanismus auch nach Blockierung des contractilen Systems vor sich gehen kann. Wenn nun auch nach dieser Beobachtung

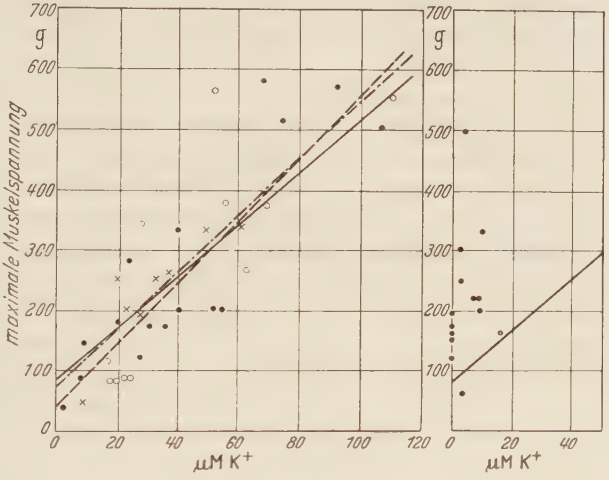


Abb. 3a Abb. 3b

Abb. 3a. Korrelation zwischen maximaler Spannungszunahme und zusätzlicher Gesamtfreisetzung an Kaliumionen nach i.a. ACh-Injektionen am denervierten M. gastrocnemius einer hinteren Katzenextremität. Volle Punkte und ausgezogene Regressionslinie: Durchstr. mit 2,0 mM/l Ca^{++}; Kreise und strichlierte Regressionslinie: Durchstr. mit 0,5 mM/l Ca^{++}; Kreuze und strichpunktierte Regressionslinie: Durchstr. mit 5,0 mM/l Ca^{++}

Abb. 3b. Korrelation zwischen maximaler Spannungszunahme und zusätzlicher Gesamtfreisetzung an Kaliumionen nach i. a. ACh-Injektionen an der innervierten Muskulatur bei 0,0 mM/l Ca^{++} in d. Durchstr. Ausgezogene Gerade: Korrelationslinie der denervierten Musk. bei 2,0 mM/l Ca^{++}

die mechanische Kontraktur als ursächlicher Faktor der ACh-Kaliumfreisetzung weitgehend ausgeschlossen werden kann, so scheint uns der umgekehrte Fall, nämlich die ursächliche Bedeutung der in der Kaliumfreisetzung sich manifestierenden Vorgänge für die Auslösung der Kontraktur wahrscheinlicher zu sein. Zur Prüfung dieser letzteren Annahme führten wir für alle in unseren Versuchen weitgehend reversibel verlaufenen Kontrakturen eine Korrelationsanalyse zwischen der maximalen entwickelten Spannung und der Größe der gleichzeitig in Erscheinung getretenen zusätzlichen Kaliumfreisetzung durch. Zu diesem Zwecke wurden in Abb. 3a die maximal entwickelten Spannungen gegen die dazugehörigen Werte der Kaliumfreisetzung aufgetragen. (Volle Punkte

und ausgezogene Gerade als dazugehörige Regressionslinie in Abb. 3a.) Der für diese Werte errechnete Korrelationskoeffizient (0,75) zeigte eine hoch signifikante Korrelation an ($P < 0{,}001$).

II. Einfluß der extracellulären Calciumionenkonzentration auf Spannungsverlauf und Kaliumfreisetzung nach ACh

a) Innervierter Muskel. Erhöhung der extracellulären Calciumkonzentration auf 5,0, 10,0 und 20,0 mM/l führte zu einer Abschwächung der Kaliumfreisetzung, die nur mehr bei hohen Dosen überhaupt noch nachweisbar war (siehe Abb. 5, IV und V, Kreuze). Bei keiner der drei Konzentrationen konnte überdies bis zu 20 μM ACh ein Auftreten einer Kontraktur beobachtet werden.

Bei 0,5 mM/l bzw. völliger Abwesenheit von Calciumionen trat nach etwa 10—20 min Einwirkungsdauer eine rasch zunehmende Empfindlichkeitssteigerung gegenüber der Kontrakturwirkung des ACh auf, die nach Erreichen eines Maximums im Laufe weiterer 30—60 min wieder abnahm (Abb. 4). In diesem Stadium maximaler Erregbarkeit führten bereits Dosen von 0,2—0,4 μM ACh zum Auftreten von Kontrakturen, was für unsere Versuche eine Herabsetzung der Schwellendosis um mindestens zwei Zehnerpotenzen bedeutet. Die Kontrakturen verliefen bei gleicher Spannungsänderung rascher als an der denervierten Muskulatur und hinterließen auch bei hohen Dosen keinen Spannungsrückstand.

Eine Verstärkung von ACh-Kontrakturen durch Calciumentzug aus der umgebenden Lösung von isolierten Präparaten wurde bereits von Harvey[9], Riesser u. Bartsch[18], sowie Punt[17], beschrieben, wobei der letzte Autor ebenso wie wir bei längerem Verweilen der Muskeln (m. recti von Fröschen) in der calciumfreien Lösung nach der anfänglichen Steigerung eine immer stärker hervortretende Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber ACh feststellen konnte. Die primäre Empfindlichkeitssteigerung des Muskels gegenüber intraarteriellen ACh-Injektionen wurde auch von Kuffler[16] beobachtet.

Trotz der deutlich in Erscheinung tretenden starken Empfindlichkeitssteigerung des Muskels gegenüber der Kontrakturwirkung des ACh war bezüglich der Kaliumfreisetzung keine Empfindlichkeitssteigerung, im Gegenteil eher noch eine leichte Abschwächung bemerkbar. (Vgl. in Abb. 5, I u. II die mit × bezeichneten Meßpunkte mit der Dosis-Wirkungskurve NI bei normalem Ca^{++}-Gehalt.) Gegenüber dem vorhin näher untersuchten Verhalten des denervierten Muskels bei normaler Ca-Konzentration bedeutet dies, daß die in Erscheinung tretenden maximalen Spannungszunahmen des innervierten Muskels bei herabgesetzter Calciumkonzentration von viel geringeren Kaliumausschüttungen begleitet werden. Dies kommt auch in Abb. 3b zum Ausdruck, in der in derselben Weise wie in Abb. 3a die maximalen Spannungen der Kontrakturen gegen die gleichzeitig in Erscheinung tretende Kaliumfreisetzung aufgetragen sind. Es ist dabei ersichtlich, daß die Maximalspannungen, die am

innervierten Muskel nach verschiedenen ACh-Dosen erhalten wurden, keinen eindeutigen Zusammenhang mit der freigesetzten Kaliummenge erkennen lassen und überdies mit einer Ausnahme sämtlich über der Korrelationslinie von Maximalspannung und Kaliumfreisetzung an der denervierten Muskulatur bei normaler Ca-Konzentration liegen. Dieser letzte Umstand würde bei Annahme einer ursächlichen Bedeutung der durch Kaliumfreisetzung angezeigten Vorgänge für die Hervorrufung der Muskelkontraktur darauf hinweisen, daß die Weiterleitung der durch die Kaliumfreisetzung angezeigten Depolarisation auf das contractile System

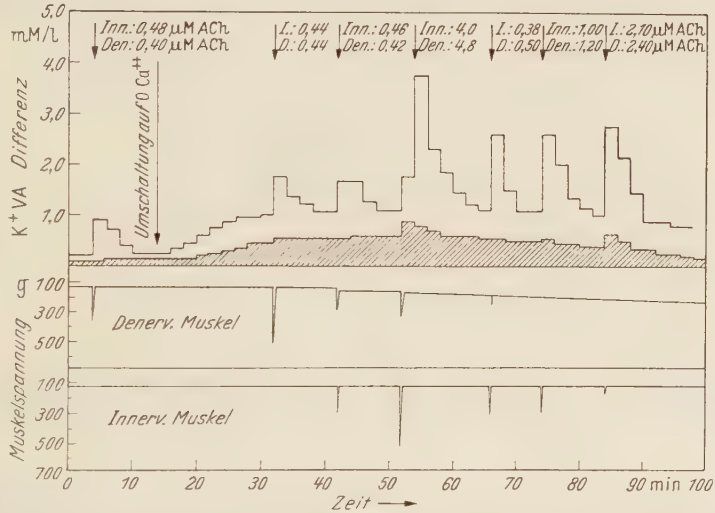


Abb. 4. VA-Differenzen der Kaliumionen sowie Spannung des M. gastrocnemius einer innervierten sowie kontralateralen chronisch denervierten isoliert durchströmten hinteren Katzenextremität. *Obere Kurve*: Kalium VA Diff. schraffierte Felder: Innerv. Muskel; leer umrandete Felder: Denerv. Muskel; *Mittlere Kurve*: Isometr. Spannungsverl. am denerv. Muskel. *Untere Kurve*: Isometr. Spannungsverlauf am innerv. Muskel. Abszisse (allen drei Kurven gemeinsam): Zeit in Minuten. Bei großem Pfeil: Umschaltung der Durchströmung von 2,0 auf 0,0 mM/l Ca^{++}, kleine Pfeile i. a. ACh-Injektionen

bei herabgesetzter extracellulärer Calciumkonzentration leichter erfolgt. Auch diese letzte Annahme spricht für eine Kaliumfreisetzung durch die Endplattenregion, da aus verschiedenen Untersuchungen bekannt ist (Coppee[5], weitere Lit. bei Brink[1]), daß die zur Erregung der Muskelfaser notwendige kritische Änderung des Ruhepotentials der Endplatte mit abnehmender Calciumkonzentration geringer wird.

Abgesehen von den Effekten nach ACh-Injektion trat in den meisten Versuchen nach Umschaltung auf die niedrige Calciumkonzentration eine langsam einsetzende Erhöhung der Spontanfreisetzung von Kaliumionen in Erscheinung, die nach etwa 20 min ihr Maximum erreicht (Abb. 4). Die dadurch angezeigte geringe Membrandepolarisation wurde bereits von Kuffler[16] potentiometrisch nachgewiesen, wobei eine Ausdehnung

über die gesamte Muskelfaser beobachtet werden konnte. Eine Membrandepolarisation durch Calciumentzug wurde außerdem noch von Jennerik u. Gerard[10] sowie neuerdings von Bülbring u. Mitarb. nachgewiesen.

b) Denervierte Muskulatur. Eine Herabsetzung der extracellulären Calciumkonzentration auf 0,5 mM/l bzw. völlige Calciumfreiheit führte an der chronisch denervierten ebenso wie an der innervierten Extremität zu einer Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber der Kontrakturwirkung des ACh. Ein einziges Mal trat dabei etwa 15 min nach der Umschaltung auf calciumfreie Lösung nach Verabreichung von 0,4 μM ACh

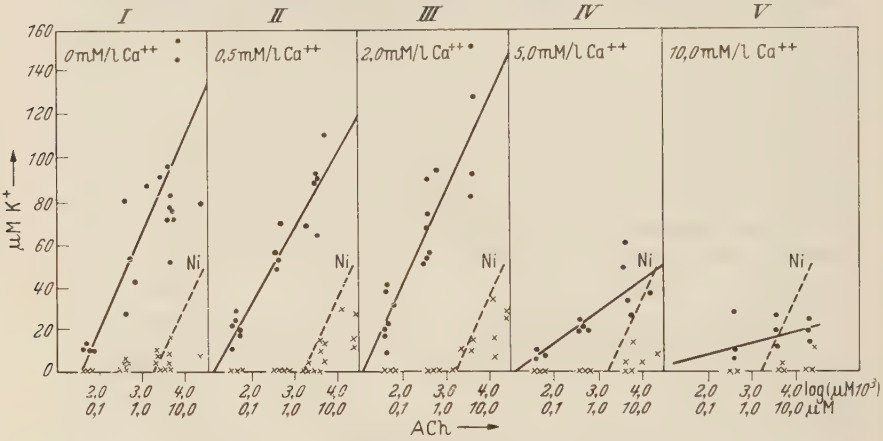


Abb. 5. Dosis-Wirkungskurven der Kaliumfreisetzung durch ACh an der chronisch denervierten (Punkte) und innervierten (Kreuze) isoliert durchströmten, hinteren Katzenextremität bei verschiedenen Calciumkonzentrationen in der Durchströmungsflüssigkeit. Ordinate: μM Kaliumionen, Abszisse: Logarithmus der ACh-Dosen. (Nullpunkt des Abszissenmaßstabes bei log ACh · 10^{-9} Mol.) NI Dosis-Wirkungskurve der innerv. Extr. bei 2,0 mM/l Ca^{++} aus (13)

knapp am Höhepunkt der Kontraktur eine kräftige Muskelzuckung auf, eine Erscheinung, die wir bisher nie in unseren Versuchen beobachten konnten. Diese Überempfindlichkeit nahm jedoch im weiteren Verlauf der Versuche viel rascher als am innervierten Muskel ab, so daß meist 30—50 min nach der Umschaltung überhaupt keine Kontraktur durch ACh am denerviertem Muskel ausgelöst werden konnte (Abb. 4).

Die venöse Kaliumkonzentration stieg nach Umschaltung auf 0,5 mM/l Ca und stärker noch nach Umschaltung auf Calciumfreiheit in den folgenden Perioden deutlicher als an der innervierten Muskulatur an (Abb. 4), was als Hinweis dafür gewertet werden kann, daß die Membranen des denervierten Muskels durch Calciumentzug stärker als die des innervierten depolarisiert werden.

Trotz der beträchtlichen Erhöhung der Spontanfreisetzung von Kaliumionen bewirkte eine intraarterielle Verabreichung von ACh eine

weitere zusätzliche Erhöhung der Kaliumausflußkonzentration (Abb. 4). Die durch Acetylcholin hervorgerufene Mehrausschüttung an Kaliumionen setzte sich der erhöhten Spontanfreisetzung auf und war hinsichtlich Grenzdosen sowie Verlauf der Dosis-Wirkungsfunktion in keiner Weise von der bei normaler Calciumkonzentration verschieden (Abb. 5, I, II, III). Die kaliumfreisetzende Wirkung war auch dann nahezu unverändert nachweisbar, wenn der denervierte Muskel bereits jede Kontrakturfähigkeit auf ACh verloren hatte (Abb. 4). Auch hier ist demnach die Kontraktur keine notwendige Voraussetzung für das Auftreten einer

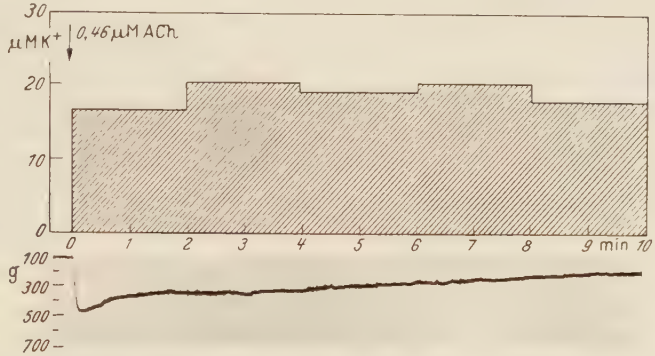


Abb. 6. Spannungsverlauf (isom. Reg.) des M. gastrocnemius und Kaliumfreisetzung in μM an der denervierten hinteren Katzenextremität nach i.a. Inj. von 0,46 μM ACh bei Durchströmung mit 20 mM/l Ca^{++}. Abzisse (beide Kurven gemeinsam): Zeit in Minuten nach der ACh-Injektion

Kaliumfreisetzung nach ACh-Injektion. Die nahezu unveränderte Kaliumfreisetzung bei niederen Calciumkonzentrationen weist wiederum auf den Zusammenhang der Kaliumfreisetzung mit der Endplattendepolarisation hin, da in den Versuchen von Del Castillo u. Stark[6] die durch ACh bewirkte Endplattendepolarisation innerhalb 0,45—7,2 mM/l Ca unverändert blieb.

Erhöhung der Calciumkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit auf 5,0, 10,0 und 20,0 mM/l führte zu einer Abschwächung der nach ACh-Injektionen auftretenden Kontrakturwirkung sowie der Freisetzung von Kaliumionen. Eine Abschwächung der depolarisierenden Wirkung des ACh war bereits bei 5,0 und 10,0 mM/l Ca bemerkbar, wie aus der Abflachung der Dosis-Wirkungskurven ersehen werden kann (Abb. 5 IV, V). Eine Bestimmung der Menge an zusätzlich in Freiheit gesetzten Kaliumionen war dabei in vielen Versuchen nicht durchführbar, da die nach der Injektion auftretende Kaliumkonzentrationserhöhung in der ausströmenden Flüssigkeit keine Tendenz zur Rückkehr auf den Ausgangswert vor ACh zeigte. Dieses Verhalten war besonders bei 20 mM/l Ca ausgeprägt, wobei auch meist die die Kaliumfreisetzung begleitende

Spannungszunahme entweder bestehen blieb oder nur langsam und unvollständig zurückging (Abb. 6).

Ein analoges Verhalten wurde von Fleckenstein u. Hertel[7] an der Froschmuskulatur beobachtet, die an dem Einfluß der Calciumkonzentration auf die durch Kaliumerhöhung ausgelöste Kontraktur zeigen konnten, daß hohe Calciumaußenkonzentrationen nicht nur den Eintritt der Depolarisation, sondern auch den Verlauf der Repolarisation außerordentlich stark verzögern und abschwächen können. Eine Herabsetzung des Austrittes von Kaliumionen aus der Muskulatur durch Erhöhung der Calciumkonzentration wurde auch von Gossweiler, Kipfer, Poretti u. Rummel[8] an isolierten Rattenzwerchfellen mittels radioaktiver Messungen festgestellt. Bei Erhöhung auf 21,5 mM/l Ca wurde die Spontanfreisetzung von Kaliumionen aus den Muskeln völlig unterdrückt.

In der Relation der Kaliumfreisetzung zur maximal entwickelten Muskelspannung trat in unseren Versuchen zwischen 0,5 und 5,0 mM/l Ca keine Veränderung ein, wobei wieder nur solche Kontrakturen gewertet wurden, die reversibel und ohne Auftreten von Restspannungen erfolgten. Die entsprechenden Korrelationslinien sind in Abb. 3a aufgetragen. (*0,5 mM/l:* strichlierte Gerade in Abb. 3a, Korrelationskoeffizient; 0,82, $0{,}01 > P > 0{,}001$; *5,0 mM/l*: strichpunktierte Gerade in Abb. 3a, Korrelationskoeffizient 0,88, $P < 0{,}001$.)

Schlußbetrachtung

Als wichtigstes Ergebnis der mitgeteilten Untersuchungen muß die Tatsache gewertet werden, daß die Kaliumfreisetzung nach ACh auch unter Bedingungen nachweisbar war, unter denen keine Spannungsänderung (Kontraktur) der Muskulatur mehr auf ACh-Verabreichung hin auftrat. Andererseits war in allen Fällen einer Kontraktur eine Kaliumfreisetzung nachweisbar, wobei bei nicht allzulanger Versuchsdauer und guter Reversibilität der Spannungsänderungen eine strenge Korrelation zwischen maximal entwickelter Spannung und Anzahl der in Freiheit gesetzten Kaliumionen bestand. Es liegt daher der Schluß nahe, daß die mit der Kaliumfreisetzung in Zusammenhang stehenden Vorgänge den primären Vorgang darstellen. Diese Folgerung, wie auch die Tatsache der Unabhängigkeit der Kaliumfreisetzung von einer Erniedrigung der Calciumkonzentration bestärkt uns im Zusammenhang mit früheren Ergebnissen (Kaliumfreisetzung nach endplattendepolarisierenden, muskellähmenden Stoffen[11], nach Einwirkung von Tetanustoxin[12], Abschwächung durch d-Tubocurarin[14]) in der Ansicht, daß die nach ACh in Erscheinung tretende Kaliumfreisetzung vorwiegend durch die Endplattenregion erfolgt. Eine Dissoziation zwischen Kaliumfreisetzung und mechanischer Reaktion des Muskels wird daher unter Versuchsbedingungen zu erwarten sein, bei denen die Weiterleitung der Membranänderung der Endplatte auf das contractile System verändert bzw. gestört ist. Unter unseren Versuchsbedingungen war dies bei Ermüdung

nach längerer Versuchsdauer bei normaler Ca-Konzentration (beschleunigt bei Calciumfreiheit), sowie bei herabgesetzter Calciumkonzentration der Fall. Im letzteren Falle traten am innervierten Muskel (bei 0,5 mM/l Ca sowie vor allem bei völliger Calciumfreiheit in der Durchströmungsflüssigkeit) Spannungsänderungen in Erscheinung, die entweder nur von einer geringen oder überhaupt nicht nachweisbaren Kaliumfreisetzung begleitet waren, worin die unter Calciummangel enorm gesteigerte Weiterleitung der Endplattendepolarisation zum Ausdruck kommt. Diese Befunde richten erneut das Augenmerk auf die Tatsache, daß in elektrophysiologischen Untersuchungen eine ursächliche Bedeutung der Tätigkeit des contractilen Systems für die Hervorrufung der elektrischen Erscheinungen an der Fasermembran ausgeschlossen wurde. Während das für den Herzmuskel bereits längere Zeit bekannt war (Übersicht bei Schütz[19]), ist es für den Skeletmuskel erst in letzter Zeit vor allem von Taylor[21] weitgehend sicher gestellt worden. Da die durch die Membranen erfolgenden Ionenverschiebungen jedoch den elektrischen Erscheinungen des aktiven Muskels zugrunde liegen, kann die Unabhängigkeit der durch ACh hervorgerufenen Kaliumverschiebungen an der Endplatte von dem Auftreten einer Spannungsänderung des Muskels als weiterer Beweis für die Unabhängigkeit der Potentialveränderungen des aktiven Muskels von den Zustandsänderungen des contractilen Systems gewertet werden. Die Kaliumverschiebungen durch die Membranen dienen ebenso wie die dabei auftretenden Veränderungen der Membranpotentiale der Erregungsverstärkung sowie Erregungsausbreitung, wobei die Vorgänge, die durch die Veränderungen der Membran zu Zustandsänderungen des contractilen Systems führen, derzeit noch völlig unbekannt sind.

Summary

The release of potassium ions from striated muscle and the changes of tension developed by the gastrocnemius muscle on intraarterial injection of acetylcholine (ACh) were investigated by isolated perfusion of hind limbs in cats. The reactions of the normal innervated and chronically denervated muscle in the same animal were compared under various calcium concentrations. The following results were obtained:

1. On the innervated muscle the threshold doses of ACh necessary to produce contractures were reduced more than 100 times with calcium concentrations below normal (0,5—0,0 mM/l); in contrast the potassium release was unaltered under the same conditions.

2. On the denervated muscle there was a significant correlation between the amount of potassium released and the maximal muscle tension after ACh doses from 0,1—2,0 μM, if the contractures were reversible.

This was proved for calcium concentrations from 0,5--5,0 mM/l. The ACh threshold doses and the regressions coefficients for the potassium release were unaltered by changes in the calcium concentration from 2 to 0 mM/l Calcium. With higher than normal calcium concentrations the potassium release following ACh injections was reduced.

3. There was no correlation between changes in muscle tension and amount of potassium release in denervated muscle under fatigue, since the contractures ceased but the potassium release remained unaltered.

From these experimental facts it is concluded: 1. The potassium is released chiefly at the depolarized endplate region and 2. The mechanical response is the result but not the cause of the phenomena manifested by the posassium release.

Literatur

[1] Brink, F.: The role of calcium ions in neural processes, Pharmacologic. Rev. **6**, 243–298 (1954). — [2] Brown, G. L.: Action potentials of normal mammalian muscle. Effects of acetylcholine and eserine. J. of Physiol. **89**, 220—237 (1937). — [3] Brown, G. L.: The action of acetylcholine on denervated mammalian and frog's muscle. J. of Physiol. **89**, 438—461 (1937). — [4] Bülbring, E., M. Holman and H. Lüllmann: Membrane potential and spontaneous activity in calcium deficient striated muscle of the frog. J. of Physiol. **132**, 12 P (1956). — [5] Coppée, G.: Le rôle des ions calcium dans la transmission neuromusculaire. Arch. Int. Physiol. **54**, 323—336 (1946). — [6] del Castillo, J., and F. Stark: The effekt of calcium ions on the motor end-plate potentials. J. of Physiol. **116**, 507—515 (1952). — [7] Fleckenstein, A., u. H. Hertel: Über die Zustandsänderungen des contractilen Systems in Abhängigkeit vom extracellulären Kalium und Natrium. Pflügers Arch. **250**, 577—597 (1948). — [8] Gossweiler, N., K. Kipfer, G. Poretti u. W. Rummel: Der Einfluß von Calcium auf den Kaliumaustritt aus Muskelgewebe. Pflügers Arch. **260**, 154—160 (1954). — [9] Harvey, A. M.: The relation between drug action and the calcium potassium ratio in striated muscle. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **68**, 494—500 (1940). — [10] Jenerick, H. P., and R. W. Gerard: Membrane potential and threshold of single muscle fibres. J. Cellul. a. Comp. Physiol. **42**, 79—102 (1953). — [11] Klupp, H., O. Kraupp, N. Honetz, W. Kobinger u. M. Laudon: Über die Freisetzung von Kalium aus der Muskulatur unter der Einwirkung einiger Muskelrelaxantien. Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 340—354 (1954). — [12] Kobinger, W., O. Kraupp, H. Stormann u. P. H. Clodi: Einfluß des lokalen Wundstarrkrampfes auf die Kaliumfreisetzung aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 425—433 (1956). — [13] Kraupp, O., G. Werner, W. Kobinger u. H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionen von Acetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 301—318 (1955). — [14] Kraupp, O., W. Kobinger, H. Stormann u. G. Werner: Über den Einfluß von Eserin und d-Tubocurarin auf die Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 403—416 (1955). — [15] Kraupp, O.: Elektrolytverschiebungen in der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur durch Acetylcholin bei Durchströmung mit natriumchloridarmer Blut-Tyrode Lösung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 271—287 (1956).

— [16] Kuffler, S. W.: The effect of calcium on the neuromuscular junction. J. of Neurophysiol. **7**, 17—26, (1944). — [17] Punt, A.: Arch. néerl. Physiol., **26**, 212, (1942); zit. nach O. Riesser: „Muskelpharmakologie und ihre Anwendung in der Therapie der Muskelkrankheiten", Bern: H. Huber 1949. — [18] Riesser, O., u. G. Bartsch: Diss. Bartsch, Frankfurt 1949; zit. nach O. Riesser: „Muskelpharmakologie und ihre Anwendung in der Therapie der Muskelkrankheiten, Bern: H. Huber 1949. — [19] Schütz, E.: Elektrophysiologie des Herzens bei einphasischer Ableitung, Erg. Physiol., **38**, 493—620 (1936). — [22] Simonart, A., et E. F. Simonart: L'Acétylcholine et le muscle strié normal de mammifère. Arch. internat. Pharmacodynamie **49**, 302—328 (1934). — [21] Taylor, R. E.: The contractile process is not associated with potential changes. J. Cellul. a. Comp. Physiol. **42**, 103—123, (1953).

Dr. Dr. O. Kraupp, Wien/Österreich, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 432—440 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Pharmakologische Beeinflussung der Erregungsleitung am Darm*

Von
Wolfgang Schaumann

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Juni 1956)

Die Bewegungsformen mancher glattmuskeliger Hohlorgane, z. B. des Ureters und vielleicht auch des Magens, scheinen mit der Annahme einer rein myogenen Erregungsleitung eine ausreichende Erklärung zu finden. Die mannigfachen Tätigkeitsformen des *Darmes* bieten ein komplizierteres Bild: es gibt am Darm gerichtete Bewegungsvorgänge, deren Zustandekommen man sich kaum ohne die Beteiligung der nervösen Elemente in der Darmwand vorstellen kann. Nach Bozler sollte man nur bei einem solchen gerichteten Bewegungsablauf, dem mit Sicherheit ein nervöser Mechanismus zugrunde liegt, von einem Darmreflex sprechen. Die Darmnerven scheinen jedoch auch an nicht gerichteten Bewegungsvorgängen beteiligt zu sein. So löste z. B. lokale Streckung des Darmes in den Versuchen von Fleisch u. Wyss Kontraktionen aus, die sowohl nach oral als auch nach anal fortgeleitet wurden. Trotzdem nahm Fleisch an, daß diese Kontraktionen neurogen zustande kamen, da sie durch Atropin, Cocain und Nicotin gehemmt wurden. Andererseits sprechen elektrophysiologische Untersuchungen auch am Darm für einen syncytialen Zusammenhang zwischen den Muskelfasern und damit für die Möglichkeit einer rein muskulären Ausbreitung von Erregungen (Übersicht siehe Greven).

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, durch pharmakologische Beeinflussung der bei lokaler Erregung des Darmes auftretenden Kontraktionen zwischen einer nervösen und einer muskulären Erregungsleitung zu differenzieren. Durch Untersuchungen an einem isolierten Vagus-Magen-Duodenumpräparat sollen Angriffspunkt und Spezifität der Wirkung der angewandten Pharmaka am Darm gesichert werden.

Methoden

Die Versuche wurden am Magen-Darmtrakt frisch getöteter Meerschweinchen durchgeführt. Die Präparate wurden bei 36—37° C in 70—90 ml Mg-freier Tyrode-Lösung suspendiert und das Bad mit 95% O_2 + 5% CO_2 durchperlt. Folgende

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Pharmaka kamen zur Anwendung: Hexamethoniumdibromid, Cocainhydrochlorid, Atropinsulfat, Morphinhydrochlorid und Histamindihydrochlorid. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Salze.

Lokale elektrische Reizung des Dünndarms. Die in der Abb. 1 dargestellte Versuchsanordnung sollte gestatten, die Fortleitung einer lokalen Erregung des Darmes nach oral und anal zu untersuchen. Ein 5—8 cm langes Darmstück wurde so über die Elektroden gelegt, daß an beiden Seiten gleich lange Stücke in die Badflüssigkeit eintauchten. Die Bewegungen der beiden freien Enden wurden bei einer Belastung von 0,5 g über Rollen auf zwei Stirnschreiber übertragen. Der Reibungswiderstand der Rollen war so gering, daß sich auch feine Spontanbewegungen registrieren ließen. Die *Elektroden* bestanden aus drei Platindrähten im Abstand von 5 mm, von denen die beiden äußeren miteinander verbunden waren und als Kathoden dienten, der mittlere als Anode. Der Darm lag auf den beiden äußeren Drähten und wurde unter dem mittleren durchgezogen. Die Elektroden waren bis auf die Enden, die mit dem Darm in Berührung kamen, isoliert. Um zu sichern, daß die auftretenden Kontraktionen durch Fortleitung lokaler Erregungen zustande kamen und nicht auf einer Erregung des ganzen Darmes durch Stromschleifen im Bad beruhten, wurde in einigen Versuchen der Spiegel des Tyrodebades durch Senkung des Niveaugefäßes bei jeder Reizung so weit erniedrigt, daß die Elektroden nicht mehr eintauchten. Die Ergebnisse wurden dadurch nicht verändert, nur waren die zur Erzielung gleichstarker Kontraktionen erforderlichen Stromstärken etwas geringer. — Die Reizung erfolgte durch Rechteckimpulse verschiedener Stärke und Frequenz, die in Abständen von 2 min 5 sec lang appliziert wurden.

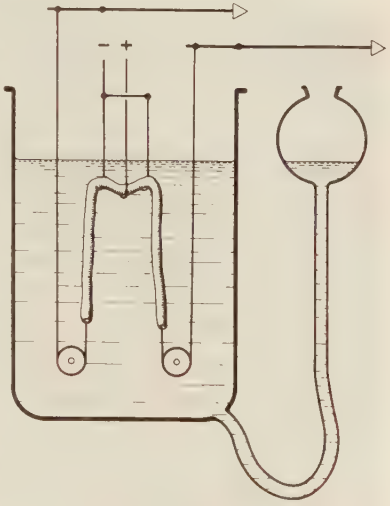


Abb. 1. *Versuchsanordnung zur lokalen elektrischen Reizung des Darmes.* Erläuterung siehe Text

Zur lokalen Applikation von Pharmaka an der Reizstelle wurden nach Senkung des Tyrode-Spiegels 0,01—0,05 ml der zu untersuchenden Lösung mit einer feinen Kanüle bei den Elektroden auf den Darm aufgetropft.

Isoliertes Vagus-Magen-Duodenumpräparat. Die Herstellung des Präparates erfolgte in Anlehnung an die Angaben von Greeff u. Holtz für das isolierte Vagus-Magenpräparat. Um die Übertragung des Vagusreizes auf den Dünndarm untersuchen zu können, wurde im Zusammenhang mit dem Magen ein ungefähr 5 cm langes Stück Duodenum herauspräpariert. Das Präparat wurde an der großen Kurvatur des Magens nahe dem Pylorus und an der amesenterialen Seite des Duodenums mit Fäden an dem horizontalen Arm eines L-förmigen Halters aus Plexiglas befestigt. Eine Darmschleife zwischen den beiden Fixierungspunkten verhinderte, daß Kontraktionen des Magens mechanisch auf das Duodenum übertragen wurden. Das freie Ende des Duodenums und des Magens war bei einer Belastung von 0,5—1 g mit den Schreibhebeln verbunden.

Ergebnisse

Lokale elektrische Reizung des Dünndarms

Jeder überschwellige Reiz führte zu einer Kontraktion sowohl des oralen als auch des analen Darmendes (Abb. 2). Durch Veränderung der *Reizintensität* ließ sich die Stärke der Kontraktionen gut abstufen: mit wachsender Stromstärke nahmen sie oral und anal gleichmäßig zu und erreichten etwa beim 20fachen Schwellenwert ihr Maximum. Dabei verkürzten sich das orale wie das anale Ende um 60—70% ihrer Länge. Die in der Abb. 2 dargestellte Stromstärke-Wirkungskurve wurde bei einer Frequenz von 30 Imp/sec bestimmt, die bei allen Stromstärken eine optimale Wirkung gab.

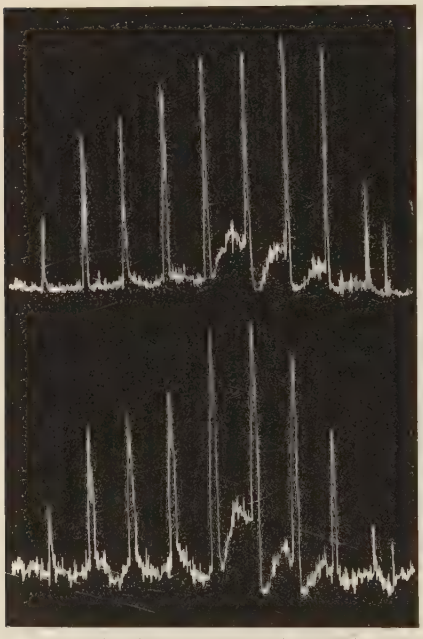


Abb. 2. *Abhängigkeit der Kontraktionsstärke von Reizintensität und -frequenz.* Meerschweinchen-Ileum in der Anordnung von Abb. 1: oben orales, unten anales Ende. *E* Einzelreiz

Bei Verminderung der *Frequenz* zeigte sich ein Unterschied in der Kontraktionsstärke des oralen und analen Darmendes: Während im Versuch der Abb. 2 die Kontraktionen oralwärts bei 10 und 3 Imp/sec noch maximal waren, nahmen sie analwärts ab. Der Unterschied war auch bei 1 Imp/sec und bei einem Einzelreiz deutlich. Andererseits konnte bei keiner Reizstärke eine Fortleitung der Erregung in nur einer Richtung beobachtet werden, wie in den Versuchen von Bozler bei lokaler elektrischer Reizung des Kaninchendarms in situ.

Obwohl der Darm nicht gefüllt war, kam es bei starken Kontraktionen der Längsmuskulatur auch zu Kontraktionen der Ringmuskulatur; schwache Kontraktionen waren dagegen von keiner Erregung der Ringmuskulatur gefolgt.

Pharmakologische Beeinflussung der Erregungsleitung

Hexamethonium hemmte in Konzentrationen von 10^{-6}—10^{-4} die Kontraktionen des oralen Darmendes stärker als die des analen. Das war bei *submaximaler* Reizung besonders deutlich: die Kontraktionen des oralen Darmstückes waren unter Umständen völlig aufgehoben, während

die des analen Endes nur um 50—60% abnahmen (Abb. 3b). Maximale Kontraktionen ließen sich auch durch hohe Konzentrationen Hexamethonium nicht ganz unterdrücken; sie wurden oral um 30—40%, anal nur um 20—30% reduziert.

Anscheinend werden submaximale Erregungen vorwiegend durch Hexamethonium-empfindliche Strukturen weitergeleitet, maximale Erre-

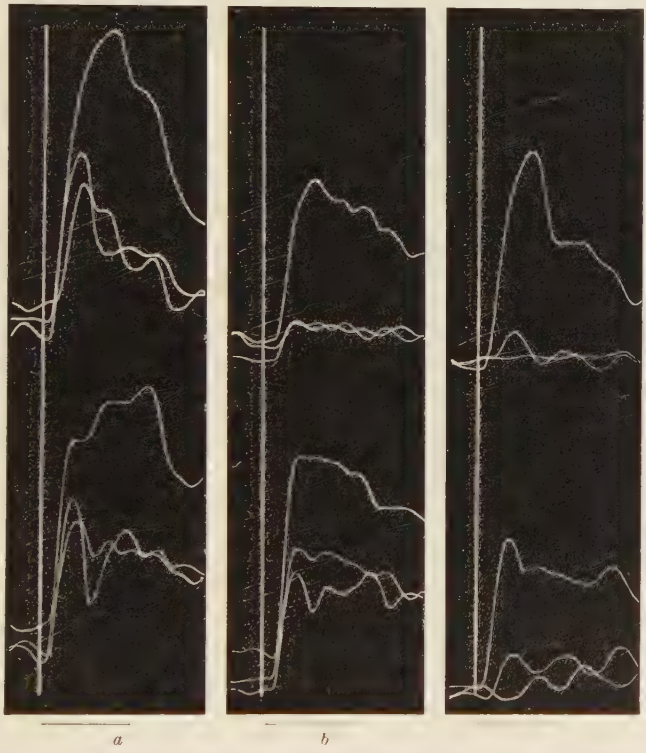


Abb. 3. *Zeitlicher Verlauf der Kontraktionen bei maximaler und submaximaler Reizstärke. Wirkung von Hexamethonium und Morphin.* Meerschweinchen-Ileum in der Anordnung von Abb. 1, Badvol. 80 ml. Orales Ende oben, anales unten. Beginn der Reizung am senkrechten weißen Strich, Dauer 5 sec (schwarzer Strich unter der Abbildung). Impulse von 0,1 msec, 30 Imp/sec. Reizung mit 20 mA (oberste), 10 mA (mittlere) und 7 mA (unterste Linie). a Kontrolle; b 1 mg Hexamethonium; c 20 μg Morphin

gungen dagegen nur zu einem kleinen Teil. Die stärkere Hemmbarkeit der Kontraktionen des oralen Endes findet wohl ebenso wie die bevorzugte Fortleitung niederfrequenter Reize nach oral ihre Erklärung in einer gerichteten, durch Synapsen übertragenen Komponente der Erregungsleitung. Sie entspricht dem „law of the intestine" von Bayliss u. Starling, wonach eine lokale Dehnung nur oral eine Kontraktion auslösen soll.

Cocain wirkte in einer Konzentration von 10^{-6} ähnlich wie Hexamethonium: es hemmte ebenfalls die Kontraktionen des oralen Endes stärker als die des analen. Cocain hat offenbar in dieser geringen Konzentration eine spezifische Affinität zu denselben Strukturen wie Hexamethonium. Im Gegensatz zu Hexamethonium nahm seine Wirkung mit steigender Konzentration zu. In Gegenwart von Cocain 10^{-4} ließen sich keine Kontraktionen mehr auslösen, auch nicht durch Erhöhung der Impulsdauer auf 5 msec.

Atropin (10^{-8}—10^{-7}) und Morphin (10^{-7}—10^{-6}) reduzierten die Kontraktionen anal gleich stark oder sogar stärker als oral. Die Fortleitung submaximaler Erregungen wurde nach beiden Richtungen vollständig gehemmt (Abb. 3c), während maximale Kontraktionen höchstens um 70% reduziert wurden. Das findet eine Parallele in Versuchen von Paton mit „coaxialer" elektrischer Reizung des Meerschweinchendarms und von Greeff u. Holtz mit direkter Reizung des Kaninchendarms. Diese Autoren fanden, daß Kontraktionen bei niedriger Reizstärke sich durch Atropin aufheben ließen, nicht aber bei Anwendung hoher Reizintensitäten. Sie schlossen daraus, daß bei niedriger Reizstärke nur postganglionäre cholinergische Strukturen erregt werden, bei hoher Reizintensität auch die Muskelfasern. In Analogie hierzu beobachteten Job, Schaumann u. Schmidt am Meerschweinchendarm unter O_2-Mangel das Auftreten von Pendelbewegungen, die im Gegensatz zu normalen Spontanbewegungen durch Morphin nicht unterdrückt werden konnten.

Die Verminderung der Kontraktionsstärke durch die untersuchten Pharmaka könnte bei der nur 5 sec betragenden Reizdauer dadurch verursacht sein, daß die Kontraktionen langsamer einsetzen und deshalb erst bei längerer Reizdauer ihr Maximum erreichen würden. In Abb. 3 wurden die Darmkontraktionen bei schnellem Lauf des Kymographions aufgezeichnet. Aus ihr geht hervor, daß Hexamethonium und Morphin Latenzzeit und Anstiegsgeschwindigkeit der Kontraktionen nicht verändern.

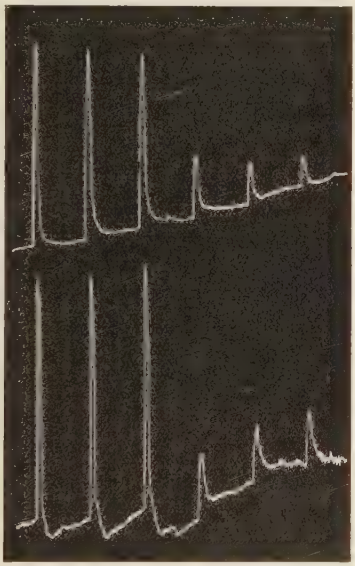
Eine Abschwächung der Darmkontraktionen könnte andererseits auch durch eine *Verminderung der lokalen Erregbarkeit* zustande kommen. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden in einigen Versuchen die Pharmaka erst nach Senkung des Tyrode-Spiegels in das Bad gegeben, sodaß sie mit der Reizstelle nicht in Berührung kamen. Auch bei diesem Vorgehen schwächten sie die Kontraktionen in der beschriebenen Weise ab. — Umgekehrt wurden die Pharmaka in anderen Versuchen nach Senkung des Flüssigkeitsspiegels nur auf das Darmstück im Bereich der Elektroden aufgetropft. Bei dieser lokalen Applikation waren Hexamethonium, Atropin und Morphin in den oben angegebenen Konzentrationen unwirksam; auch bedeutend höhere Konzentrationen hatten keinen sicheren Effekt. Cocain ($5 \cdot 10^{-4}$) dagegen hob die lokale elektrische

Erregbarkeit auf; auch bei einer Impulsdauer von 5 msec wurden keine Kontraktionen mehr ausgelöst. Die vollständige Hemmung der Kontraktionen bei Zugabe hoher Konzentrationen Cocain zum Bad kann daher mit einer Aufhebung der lokalen Erregbarkeit erklärt werden.

Eine durch *Histamin* 10^{-5} verursachte lokale Erregung wurde ebenfalls in beiden Richtungen fortgeleitet. Die auf diese Weise ausgelösten Kontraktionen konnten durch Atropin und Morphin nicht sicher reduziert werden.

Isoliertes Vagus-Magen-Duodenumpräparat

Das Duodenum wird von Vagusfasern innerviert, die von den rami hepatici des Vagus abzweigen und zum Darm ziehen (McCrea). Im Pylorus und oberen Duodenum enden sie in einer besonders starken Anhäufung der Ganglienzellen (Irwin). Während es bei lokaler elektrischer Reizung des Darmes nicht sicher ist, ob Darmnerven, Muskelzellen oder beide erregt werden, ist bei Reizung des Vagus der Erregungsablauf über präganglionäre Fasern, ganglionäre Synapsen und postganglionäre Strukturen anatomisch und funktionell eindeutig. Das Vagus-Magen-Duodenumpräparat bietet daher die Möglichkeit, den Angriffspunkt von Pharmaka zuverlässiger zu bestimmen, als das bei lokaler elektrischer Reizung des Darmes möglich ist.



↑
1 mg Hex.

Abb. 4. *Wirkung von Hexamethonium auf die Kontraktionen von Magen und Duodenum nach Vagusreiz.* Isoliertes Vagus-Magen-Duodenumpräparat in 80 ml Tyrodelösung. Vagusreiz alle 3 min 10 sec lang mit 10 mA, 0,5 msec und 10 Imp/sec
oben Magen, unten Duodenum

Hexamethonium (0,5—2 · 10^{-5}) hemmte die Wirkung des Vagusreizes an Magen und Darm (Abb. 4). Diese Wirkung kann wohl mit Sicherheit auf eine Blockierung der ganglionären Übertragung zurückgeführt werden. Hexamethonium hat in dieser Dosierung keine Nebenwirkung auf postganglionäre Strukturen im Magen (Greeff u. Holtz). In den eigenen Versuchen setzte Hexamethonium im Gegensatz zu postganglionär angreifenden Substanzen den Tonus des Duodenums nicht herab. Daraus kann man schließen, daß Hexamethonium die Fortleitung *lokaler* Erregungen am Darm nur über eine Hemmung ganglionärer Synapsen beeinflußt.

Cocain wirkte in derselben Dosierung und in gleicher Weise wie Hexamethonium. Auch seine Wirkung kann in diesen niederen Konzentrationen mit einer Hemmung der ganglionären Übertragung erklärt werden.

Atropin (0,5—$2 \cdot 10^{-8}$) und *Morphin* (0,3—$3 \cdot 10^{-7}$) setzten im Gegensatz zu Hexamethonium und Cocain den Tonus des Duodenums herab. Sie hemmten den Vagusreiz am Darm, ohne ihn in diesen Konzentrationen am Magen nennenswert abzuschwächen (Abb. 5). Ein Unterschied zwischen Atropin und Morphin wurde bei Verwendung höherer Konzentrationen deutlich. Während Atropin 10^{-7}—10^{-6} die Wirkung des Vagusreizes auch am Magen hemmt (Greeff u. Holtz), hatte Morphin auf die Kontraktionen des Magens selbst in Konzentrationen bis $2 \cdot 10^{-5}$ keinen sicheren Effekt. Im Versuch der Abb. 5 verursachte Morphin $6 \cdot 10^{-6}$ eine eben erkennbare Reduktion der Magenkontraktionen. Diese wurde jedoch auch bei längerer Einwirkung — wiederum im Gegensatz zu Atropin — nicht stärker. Eine ganglionäre Wirkung kann daher, zumindest für Morphin, ausgeschlossen werden.

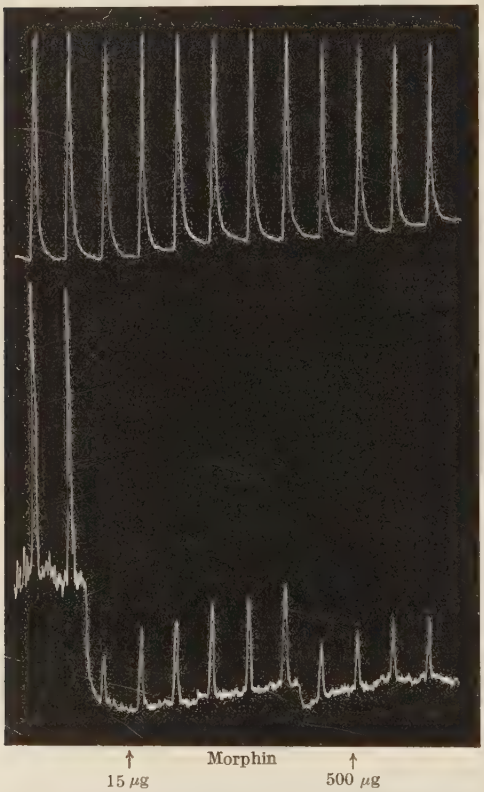


Abb. 5. *Wirkung von Morphin auf die Kontraktionen von Magen und Duodenum nach Vagusreiz.* Isoliertes Vagus-Magen-Duodenumpräparat in 80 ml Tyrodelösung. Vagusreiz alle 2 min 10 sec lang mit 20 mA, 0,5 msec und 10 Imp/sec. Erst 15 µg, nach 12 min weitere 500 µg Morphin

Atropin verhindert bekanntlich die Erregungsübertragung von postganglionären Fasern auf das Erfolgsorgan, indem es die Wirkung des freigesetzten Acetylcholins hemmt. Morphin wirkt am Meerschweinchendarm ähnlich wie Atropin, ist aber kein Antagonist des Acetylcholins (Schaumann). Seine Wirkung beruht wahrscheinlich auf einer Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung (unveröffentl. Vers.).

Besprechung der Ergebnisse

Lokale elektrische Erregungen des Meerschweinchendarmes breiten sich sowohl oral- als auch analwärts aus. Bei optimaler Reizfrequenz (30 Imp/sec) kontrahieren sich das orale und das anale Darmstück

gleichstark, bei niederen Frequenzen erfolgt die Erregungsleitung jedoch bevorzugt oral. Nach Bozler kann man bei einer solchen gerichteten Erregungsleitung eine Beteiligung ganglionärer Synapsen annehmen. Pharmaka mit einer spezifischen Affinität zu ganglionären Strukturen wie Hexamethonium und Cocain hemmen maximale Kontraktionen des oralen Darmendes stärker als diejenige des analen und können submaximale ganz aufheben. Das spricht dafür, daß submaximale Erregungen vorwiegend unter Beteiligung von *Ganglienzellen* fortgeleitet werden.

Aus der Wirkung des Morphins am Vagus-Magen-Duodenumpräparat geht hervor, daß es die Übertragung der Erregung von postganglionären Strukturen auf die Muskulatur verhindert. Da es die Fortleitung lokaler elektrischer Erregungen stärker hemmt als Hexamethonium und Cocain und seine Wirkung auf das orale und anale Darmende gleich stark ist, muß die Erregungsleitung zum Teil ohne Beteiligung von Ganglienzellen auf dem Wege *postganglionärer Strukturen* erfolgen, die gegen Hexamethonium und Cocain unempfindlich sind. Atropin wirkt in niederen Konzentrationen ähnlich wie Morphin.

Elektrisch ausgelöste maximale Darmkontraktionen lassen sich weder durch Hexamethonium, noch durch Morphin und Atropin vollständig aufheben, sondern nur abschwächen. Auch die durch lokale Applikation von Histamin verursachten Kontraktionen sind gegen diese Pharmaka resistent. Bei maximaler elektrischer Reizung und bei lokaler Erregung durch Histamin dürfte demnach die Erregungsleitung, soweit sie durch die benutzten Pharmaka nicht beeinflußbar ist, über die *Muskulatur* erfolgen.

Dagegen spricht auch nicht, daß Cocain in hohen Konzentrationen selbst maximale Darmkontraktionen vollständig aufheben konnte; wie Versuche mit lokaler Applikation von Cocain im Bereich der Elektroden zeigten, heben diese Konzentrationen gleichzeitig auch die lokale *Erregbarkeit* auf.

Aus der Beeinflussung der Fortleitung einer lokalen Erregung des Darmes durch Pharmaka geht nicht hervor, welche Strukturen in der Darmwand durch den lokalen Reiz erregt werden. Die Empfindlichkeit submaximaler Kontraktionen gegen Hexamethonium, Atropin und Morphin legt jedoch in Analogie zu den Verhältnissen am Vagus-Magen-Duodenumpräparat den Gedanken nahe, daß durch submaximale elektrische Impulse prä- und postganglionäre nervöse Strukturen erregt werden. Dagegen könnte die gegen die genannten Pharmaka unempfindliche Komponente der Erregungsleitung bei maximaler Reizintensität durch eine lokale Erregung der Muskelzellen ausgelöst werden. Dafür spricht, daß diese Pharmaka die Fortleitung einer lokalen Erregung der Muskulatur durch Histamin ebenfalls nicht hemmen.

Summary and conclusions

Isolated strips of the guinea-pig's small intestine were stimulated by local application of electrical impulses or of histamine. The local excitations were conducted in the intestinal wall in an oral as well as in an aboral direction and resulted in contractions of the intestine which varied in strength with the intensity of local stimulation. It was concluded from the observed effects of hexamethonium, cocaine, atropine, and morphine on these contractions that three different mechanisms may be concerned in the conduction of local excitations:

1. Preganglionic fibres which at low frequencies conduct preferably in an oral direction. Excitation along these fibres is mediated by ganglion cells and can be blocked by hexamethonium and low concentrations of cocaine.

2. Postganglionic structures which conduct equally well in both directions. The effects of their stimulation can be abolished by atropine and morphine.

3. A muscular syncytium in which the conduction of excitations is unaffected by autonomic blocking drugs.

In an isolated preparation of the vagus nerves, stomach and duodenum of the guinea-pig, contractions of the stomach and of the duodenum were elicited by stimulation of the vagi. By observing the effects of hexamethonium, cocaine, atropine, and morphine on this preparation it was possible to establish their point of attack in the intestine and to test the specificity of their actions.

Literatur

Bayliss, W. M., and E. A. Starling: J. of Physiol. **24**, 99 (1899). — Bozler, E.: Amer. J. Physiol. **157**, 329, 338 (1949). — Fleisch, A.: Pflügers Arch. **220**, 512 (1928). — Fleisch, A., u. W. H. v. Wyss: Pflügers Arch. **200**, 290 (1923). — Greeff, K., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 427 (1956). — Greven, K.: Klin. Wschr. **1955**, 241. — Irwin, D. A.: Amer. J. Anat. **49**, 141 (1931). — Job, C., O. Schaumann u. H. Schmidt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 130 (1955). - McCrea, E. A.: J. of Anat. **59**, 18 (1924). — Paton, W. D. M.: J. of Physiol. **127**, 40 P (1955). — Schaumann, W.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 456 (1955).

Dr. W. Schaumann, Frankfurt/Main, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 441—449 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die Standardisierung des roten Blutfarbstoffes durch Hämiglobincyanid

I. Mitteilung

Bestimmung der spezifischen Extinktion von Hämiglobincyanid

Von

Jürgen Meyer-Wilmes und Herbert Remmer

(Eingegangen am 4. Juli 1956)

Mit den üblichen colorimetrischen Bestimmungsmethoden für Hämoglobin ist es nicht möglich, genaue Resultate zu erzielen. Diese Verfahren vergleichen meist die Farbe des roten Blutfarbstoffes oder eines bestimmten Umwandlungsproduktes mit einer Vergleichslösung oder einem Farbglas.

Geeignete Standardlösungen herzustellen und deren Hämoglobingehalt genau zu messen, bietet die größten Schwierigkeiten. Nur Laboratorien, die mit den nötigen Hilfsmitteln ausgestattet sind, können Hb genau aus dem Eisengehalt oder aus der Gasfreisetzung bestimmen. Kleinere Laboratorien sind auf eingestellte Lösungen oder entsprechende Farbgläser angewiesen. Die Haltbarkeit der meisten Lösungen ist aber sehr gering. Oxyhämoglobin geht schnell in Hämiglobin über, auch COHb ist nur dann beständig, wenn sorgfältig jede Spur O_2 von der Lösung ferngehalten wird.

Versuche, an Stelle von O_2Hb oder COHb Farbgläser zu verwenden, scheitern an der komplizierten Lichtabsorption dieser Farbstoffe. Reduziertes Hb ist auch nicht geeignet, da das zuverlässigste Reduktionsmittel $Na_2S_2O_3$ nicht nur mit dem Hb-Eisen reagiert.

Auch eine Umwandlung des roten Blutfarbstoffes in Hämiglobin (Hb^-) ist nicht zu empfehlen, da die Farbe dieser Verbindung sehr stark p_H-abhängig ist.

Die saure Hämatinlösung, von Sahli eingeführt, eignet sich ebenfalls schlecht zur Hb-Bestimmung (Barkan 1936 und 1937; Barkan u. Olesk; Heilmeyer u. Sundermann; Heilmeyer u. v. Mutius).

Das gleiche gilt für das alkalische Hämoglobin (Weise; Gibson u. Harrison; Clegg u. King). Unter Führung von King bemühten sich mehrere englische Institute einen geeigneten Hämoglobinstandard herzustellen (King u. Gilchrist 1947 II), (King, Gilchrist u. a. 1948 II). Sie empfahlen Cyanhämatin, bereitet aus kristalliertem Hämin. Leider ist das Absorptionsspektrum dieses Farbstoffes nicht identisch mit Cyanhämatin, welches aus Blut durch Einwirken von Cyanid in salzsaurer Lösung gewonnen wird.

Seit Jahren benutzten wir die Hämiglobincyanidmethode zur Hämoglobinbestimmung (Evelyn u. Malloy; Havemann). Die dabei gesammelten Erfahrungen veranlaßten uns, die Brauchbarkeit der Hämiglobincyanidlösung zur Standardisierung zu prüfen.

Da Zweifel an der Gültigkeit des von Drabkin u. Austin (1932) gemessenen spezifischen Extinktionswertes auftauchten, bestimmten wir diesen nochmals, wobei wir uns bemühten, die Eisenanalyse besonders exakt durchzuführen. Dabei beobachteten wir deutliche Differenzen zwischen Fe-Gehalt und O_2-Bindung von Pferdehämoglobin, das wir für diese Untersuchungen benutzten.

Methodik

Pferdeblut wurde in einer Natriumcitratlösung aufgefangen und zentrifugiert. Nach Entfernung des Serums und 4maligem Waschen der Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung, um eventuell vorhandene reduzierende Substanzen möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Blutkörperchen mit Toluol hämolysiert.

Sämtliche optischen Messungen wurden im Spektralphotometer nach Beckmann vorgenommen. Die p_H-Werte wurden mit der Glaselektrode bestimmt.

Die Sauerstoff-Freisetzung bestimmten wir manometrisch in der Warburg-Apparatur (Remmer u. Meyer-Wilmes). Der Hämiglobingehalt wurde nach der Methode von Havemann durch Aufhellung mit KCN bei 630 mμ gemessen.

Das Hämoglobin oxydierten wir in einer Verdünnung von 1:100 mit einem Überschuß von Ferricyanid und setzten der Lösung 1 Tropfen einer 10%igen KCN-Lösung hinzu. Sämtliche Ansätze enthielten 25% m/15 Phosphatpuffer vom p_H 6,8. Die Extinktion des gebildeten Methämoglobincyanids wurde bei 540 mμ gemessen (d = 1,0 cm). Der Zusatz eines 4—5fachen Überschusses an Kaliumferricyanid störte die Absorption der Lösung nicht. Die spezifische Extinktion von Ferricyanid bei der benutzten Wellenlänge erreicht nur einen Wert von $\varepsilon = 0{,}00028$; ε von Ferrocyanid ist noch geringer.

Das Hämoglobin-Eisen läßt sich sowohl colorimetrisch als auch titrimetrisch bestimmen. Die größten Schwierigkeiten bietet eine einwandfreie Veraschung, die wir zuerst feucht mit konzentrierter H_2SO_4 und $HClO_4$ versuchten. Die Resultate schwankten aber zu stark. Die titrimetrischen Methoden und die Veraschungsmethoden haben King und eine große Zahl von Mitarbeitern (1948 I) in verschiedenen britischen Instituten eingehend auf ihre Brauchbarkeit studiert. Sie entschieden sich für ein Verfahren, daß von uns nur geringfügig variiert wurde:

Die Veraschung von 10—20 cm³ Hämoglobinlösung erfolgte mit 2 cm³ konzentrierter HNO_3. Um Eisenverluste durch Schaumbildung zu

vermeiden, muß zuerst bei einer Temperatur von nur 70—80° C das Wasser verdampft werden, am besten im Trockenschrank. Dann wird allmählich bis zur vollständigen Trocknung des Rückstandes auf 90 bis 100° C erhitzt. Anschließend kam das Präparat zur Veraschung für 12—24 Std in einen elektrischen Ofen, dessen Temperatur langsam bis auf 400—450° C gesteigert wurde. Diese darf nicht überschritten werden. Gelöst wurde das veraschte Eisen in 2—5 cm^3 konzentrierter HCl. Das 3wertige Eisen wurde dann mit Titantrichlorid nach einer Vorschrift von Biltz titriert. Diese Methode liefert nur dann sehr genaue Resultate, wenn sie unter Abschluß von Luftsauerstoff durchgeführt wird. Die Titantrichlorid-Lösung stand unter CO_2-Druck. Außerdem ist es notwendig, daß während der Titration die Eisenlösung von CO_2 durchströmt wird. Der Titer der Titantrichlorid-Lösung wurde jeweils vor der Titration mit einer Standard-Lösung aus Ferriammoniumsulfat eingestellt. Als Indicator diente Kalium-Rhodanid. Auf eine genaue Bestimmung der Standardlösung wurde besonderer Wert gelegt, da die Genauigkeit der Methode in erster Linie davon abhängt. Wir titrierten diese sowohl jodometrisch als auch nach Reduktion (Cd-Reduktor) mit Permanganat und Chromat. Die 3 Methoden lieferten sehr gut übereinstimmende Ergebnisse. Aus 11 Bestimmungen erhielten wir für 10,0 n/10 Standardlösung einen Mittelwert von 54,84 mg Eisen mit einem Fehler von nur 0,2%.

Tabelle 1. *Titration von 10,0n/10 Fe-Standardlösungen. Werte in mg Fe*

mit $K_2Cr_2O_7$	mit $KMnO_4$	jodometrisch
54,73	54,98	54,62
54,78	54,85	54,69
54,75	54,91	54,74
	54,94	
	54,89	
Mittelwert:	54,84 ±	0,2%

Leider liefert diese Methode nur dann exakte Resultate, wenn mindestens 1 mg Eisen bestimmt werden soll. Da in den beschriebenen Versuchen häufig nur kleine Hämoglobinmengen zur Verfügung standen, mußte eine andere Methode hinzugezogen werden.

Unter den colorimetrischen Verfahren konnte sich die Messung als Eisenrhodanid-Komplex (Kennedy) nicht durchsetzen. Gebräuchlich sind o-Phenanthrolin (Heilmyer u. Plötner, 1937) und Dipyridil (Hill), die mit 2wertigem Eisen einen gefärbten Komplex bilden. Die meisten Autoren bevorzugen o-Phenanthrolin für Mikrobestimmungen, da die Komplex-Verbindung dieser Substanz mit dem Eisen eine um 30% höhere Extinktion besitzt, als der Fe-Dipyridil-Komplex. Diese Methode ist von Drabkin (1941), Bruckmann u. Zondeck, Borei u. Laurell variiert worden. Ihr Nachteil liegt in der Abhängigkeit der Färbung vom p_H-Wert und von der Salz-Konzentration. Bei den bisher angewandten Verfahren wird der p_H-Wert durch Neutralisation der Eisenlösung und anschließende Zugabe einer bestimmten Säuremenge

eingestellt. Die dadurch geschaffene Salzkonzentration wirkt sehr störend, besonders ungünstig auf die Geschwindigkeit der Bildung des Farbstoffkomplexes. Ungenauigkeiten dieser Methode sind auf solche Fehlerquellen zurückzuführen. Wir versuchten diese dadurch auszuschalten, daß wir das vorhandene Eisen durch Ausfällen von den Salzen befreiten. Die Durchführung wird dadurch umständlicher; aber eine größere Genauigkeit ist der Gewinn. Im einzelnen gingen wir folgendermaßen vor:

Wie oben beschrieben, wurde das Hämoglobin verascht. Bei kleinen Mengen ist das wesentlich leichter. Das veraschte Eisen wurde in 2,0 konzentrierter HCl gelöst, die auf 25,0 mit H_2O aufgefüllt wurden. Davon kamen jeweils 5 cm³, 100—200 γ Fe^{III} enthaltend in ein Zentrifugenglas. Nach Erhitzen der Gläser im Trockenschrank wurden die noch heißen Lösungen mit 2 cm³ konzentriertem Ammoniak versetzt und blieben 20 min bei 100° C stehen. Nach Erkalten wurden sie zentrifugiert. Der Ferrihydroxyd-Niederschlag wurde 2 mal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 5 cm³ n/20 H_2SO_4 gelöst. Wir ließen darauf die Ansätze wieder 3 Std bei 100° C, um eine vollständige Lösung zu erreichen. Wegen der Alterung des Niederschlages ist es nötig, sofort nach dem Waschen die Auflösung vorzunehmen. Mit 1 cm³ einer 10%igen Natriumbisulfitlösung reduzierten wir das 3wertige Eisen. Die Reduktion ging wieder im Trockenschrank bei 100° C vor sich (etwa ½ Std). Nach dem Erkalten erhielten die Ansätze 0,5 cm³ einer 1%igen o-Phenanthrolinlösung (in n/20-Schwefelsäure) und wurden in Meßkolben verdünnt. Die Messung erfolgte spekrophotometrisch. Als Kontrollen liefen jeweils 2 Ansätze ohne Eisen durch den Untersuchungsgang mit. Ihre Werte wurden jeweils abgezogen.

Tabelle 2. *Extinktion des Fe-o-Phenanthrolinkomplexes.* (d = 1 cm)

10^{-5} Mol/e Fe			
	1,0	2,0	4,0
	0,106	0,216	0,429
	0,107	0,214	0,430
	0,104	0,217	0,426
	0,104	0,216	0,425
	0,104	0,215	0,425
	0,106	0,214	
M	0,105	0,215	0,427
σ%	±1,2	±0,55	±0,53

Der o-Phenanthrolin-Eisenkomplex hat ein Absorptionsmaximum bei 508 mμ. Die Eichkurve, deren Meßwerte durch verschiedene Verdünnungen der Eisenstandardlösung (siehe oben) bestimmt wurden, entsprach dem Beerschen Gesetz. Beim Arbeiten unter den angegebenen Bedingungen weisen Bestimmungen von 100—200 γ Eisen eine brauchbare Genauigkeit auf. Ein Beispiel zeigt Tab. 2.

Die Färbung der Lösungen trat nach Zusatz von Phenanthrolin sofort ein. Bereits nach 5 min war die maximale Farbintensität erreicht. Über längere Zeit blieb der Farbkomplex unverändert. Nach 24 Std war die Extinktion des Farbstoffes nur um 0,5—0,7% abgesunken (Tab. 3).

Unter den angegebenen Bedingungen betrug der p_H-Wert der Lösungen 2,7—2,8. SCHÄFER hat bereits gezeigt, daß die Farbe nur bei einem p_H unter 3,0 beständig ist. Die Ergebnisse von SCHÄFER konnten bestätigt werden; wenn aber nach 24 Std die Lösungen noch einmal

Tabelle 3. *Konstanz des Fe-o-Phenanthrolinkomplexes*

Zeit	E
5 min	0,411
10 „	0,413
30 „	0,412
1 Std	0,412
2 „	0,412
4 „	0,411
24 „	0,409

Tabelle 4

p_H	Zeit	
	1½ Std	24 Std
3,32	0,219	0,221
3,17	0,219	0,219
2,71	0,218	0,217
2,32	0,217	0,131
2,10	0,217	0,065

gemessen wurden, trat eine Abnahme der Farbintensität in den Lösungen auf, deren p_H-Wert kleiner als 2,5 war (Tab. 4). Deshalb muß ein p_H-Wert zwischen 2,5 und 3,0 eingehalten werden.

Bestimmungen, bei denen die angegebenen Bedingungen eingehalten werden, können sehr genau ausgeführt werden, wie folgender Kontrollversuch zeigt, in dem nach Veraschen das Fe als o-Phenanthrolinkomplex gemessen wurde.

Tabelle 5

	10^{-6} Mol Fe
Hb-Lösung*	12,9
Fe-Standard-Lösung	4,91
Summe	17,81
gefunden	17,72
Abweichung	0,5%

* Fe-Gehalt titanometrisch bestimmt.

Ergebnisse

Als Beispiel sind die einzelnen Daten zweier Bestimmungen der spezifischen Extinktion in den Tab. 6 und 7 angeführt. Insgesamt standen uns 16 verschiedene Pferdehämoglobinlösungen zur Verfügung (Tab. 8). Der auf der Basis der 2 Eisenbestimmungen ermittelte Wert betrug 11,0 ± 0,13. Dagegen ist die spezifische Extinktion von Hb^+CN, aus der O_2-Freisetzung berechnet, mit 11,4 ± 0,12 um fast 4% höher. Die niedrige mittlere Abweichung ist ein Zeichen für die große Genauigkeit der beiden Messungen.

Die Extinktion von Hb^+-CN ist weitgehend p_H-unabhängig, wie Tab. 9 zeigt. Zur Einstellung des p_H-Wertes benutzten wir Phosphat- oder Boratpuffer. Nur in stärker alkalischer Lösung macht sich ein geringer Anstieg der Extinktion bemerkbar. Sogar bei Zimmertemperatur ist es möglich, Hb^+CN-Lösungen über mehrere Monate aufzubewahren (Tab. 10). In 3½ Monaten nahm die Extinktion nur um 1% ab.

Diskussion

Zur Bestimmung des gesamten Blutfarbstoffes in Pferdehämoglobinlösungen dienten uns 2 verschiedene Methoden, die Eisenanalyse und die Messung des vom Hb gebundenen O_2. Daneben wurde Hämiglobin colorimetrisch gemessen und der Gesamthämoglobinwert ($Hb + HB^+$) berechnet. Dieser war 4% niedriger als es dem Fe-Gehalt entsprach. Vermutlich ist die O_2-Sättigung nicht vollständig, da sie bei gleichem O_2-Druck nicht nur von der Hämoglobinart, sondern auch von der Natur und Konzentration der anwesenden Elektrolyten abhängig ist (Barron). Außerdem ist es möglich, daß Pferdehämoglobinlösungen neben

Tabelle 6

	E Hb^+-CN (540 mμ) d = 1 cm 1,0 ml Hb-Lösung Verd. 1:100	O_2 Freisetzung pro 1,0 ml Hb-Lösung mm³	HbO_2 Mol × 10^{-6}	Hb^+ %	Hb^+ Mol × 10^{-6}	$HbO_2 + Hb^+$ in 1,0 ml Lösung Mol × 10^{-6}	ε Hb^+-CN 10^{-3} Mol/l	Fe-Titration Verbrauch an $TiCl_3$: 10,0 ml Stand. = 5,48 mg Fe	8,0 Hb-Lösung verascht[1]	Hb-Fe 10^{-6} Mol/ml	ε Hb^+- 10^- Mol
1. Bestim.		203	9,06					7,07	5,61		
2. Bestim.		202	9,02					7,09	5,64		
3. Bestim.		206	9,19					7,10	5,62		
Mittelwert	1,060	203,7	9,09	3,2	0,30	9,39	11,30	7,09	5,623	9,74	10,

[1] 3 verschiedene Veraschungen derselben Hämoglobinlösung.

Tabelle 7

	E Hb^+-CN 540 mμ d = 1,0 1,0 ml Hb-Lösung Verd. 1:100	O_2 Freisetzung pro 1,0 ml Hb-Lösung mm³	HbO_2 Mol × 10^{-6}	Hb^+ %	Hb^+ Mol × 10^{-6}	$HbO_2 + Hb^+$ in 1 ml Mol × 10^{-6}	ε Hb^+ CN 10^{-3} Mol/l		E Fe-o-Phenanthrolinkompl. je 0,4 ml Hb-Lösung verascht in 100,0 gelöst d = 1,0	Hb-Fe in 1,0 ml Hb-Lösung 10^{-6} Mol	ε Hb^+- 10^- Mol
1. Messung		135						1. Veraschung	0,275; 0,273; 0,275; 0,277		
2. Messung		136						2. Veraschung	0,276; 0,278; 0,275; 0,273		
3. Messung		135						3. Veraschung	0,275; 0,274; 0,276		
4. Messung		133,5									
Mittelwert	0,702	135	6,03	3,1	0,19	6,22	11,30		0,275 ±05%	6,45	10,

dem Hämiglobin noch kleine Mengen von Verdoglobin (Kiese) enthalten, das als inaktiver Blutfarbstoff nur durch die Eisenanalyse erfaßt wird.

Die Schwierigkeit einer exakten Bestimmung der spezifischen Extinktion von Hb^+CN, die in den beiden differierenden Werten von 11,0 und 11,4 zum Ausdruck kommt, zeigt sich auch darin, das von Drabkin

Tabelle 8

Nr.	E Hb^+ CN	Hb-Fe-Bestimmung colorimetrische (o-Phenantr.)		Hb-Fe-Bestimmung titrimetrisch ($Ti Cl_3$)		Hb-Bestimmung manometrisch		Bemerkungen
	540 mμ d = 1,0 Verd.: 1:100	Fe-Gehalt in 10^{-6} Mol/cm³	ε (Hb^+ CN) 10^{-3} Mol/l	Fe-Gehalt in 10^{-6} Mol/cm³	ε (Hb^+ CN) 10^{-3} Mol/l	HbO_2 + Hb^+ 10^{-6} Mol/cm³	ε (Hb^+ CN) 10^{-3} Mol/l	
1	0,381			3,51	10,9	3,36	11,35	mit H_2O hämolysiert und kristallisiert
2	0,313			2,85	11,0	2,71	11,55	
3	1,060			9,74	10,9	9,39	11,3	nur mit H_2O hämolysiert
4	0,906	8,19	11,1	8,11	11,2			
5	0,897	8,00	11,2	8,10	11,1			
6	1,060			9,68	11,0	9,48	11,2	
7	0,645	5,98	10,8	6,00	10,8			
8	0,603	5,55	10,9	5,55	10,9			
9	1,020	9,28	10,9	9,35	10,9			
10	0,917	8,26	11,1	8,24	11,1			nur mit Toluol hämolysiert
11	0,875	8,04	10,9			7,63	11,45	
12	0,785	7,16	11,0	7,13	11,0			
13	0,702	6,45	10,9			6,22	11,3	
14	0,800	7,16	11,2	7,13	11,2	6,94	11,5	
15	0,698	6,41	10,9					
16	0,845	7,73	11,0					
Mittelwerte			11,0		11,0		11,4	
mittlere Abweichung			0,128		0,128		0,115	
σ%			1,2		1,2		1,0	

Tabelle 9

pH	EHb⁺-CN (540 mμ) jeweils 4 Ansätze			
6,2	0,205	0,206	0,206	0,205
6,52	0,207	0,206	0,205	0,205
7,52	0,205	0,205	0,205	0,205
9,15	0,206	0,206	0,206	0,206
9,36	0,205	0,205	0,206	0,205
9,59	0,206	0,206	0,206	0,205
9,70	0,207	0,208	0,207	0,208
9,95	0,210	0,211	0,211	0,210

Die p_H-Werte wurden mit der Glaselektrode gemessen.

u. Austin (1932 und 1935/36) ihren Hb-Bestimmungen eine Hb^+CN-Extinktion von 11,5 zugrunde gelegt wurde. Die beiden Autoren benutzten Hundeblut, das im Tonometer mit O_2 gesättigt wurde und bestimmten in der Apparatur nach van Slyke die O_2-Freisetzung. Daraus berechneten sie die spezifische Extinktion. Der von ihnen bestimmte Wert (11,5) stimmt fast mit dem überein, der von uns auf ähnliche Weise aus dem Pferdehämoglobin durch O_2-Messung ermittelt wurde. Daß der letztere vermutlich auf einer unzureichenden O_2HB-Bestimmung basiert, wurde oben bereits diskutiert. Der relativ hohe Wert von 11,5 in den Bestimmungen von Drabkin u. Austin kommt dadurch zustande, daß im gesamten Bereich ihrer Hb^+CN-Absorptionskurve die spezifischen Extinktionen um 0,5 höher liegen, als die von uns gemessenen (11,0), was auf eine gewisse Trübung der Lösung schließen läßt. Sowohl die spektrophotometrischen Messungen als auch die Fe- oder gasanalytischen Bestimmungen besitzen Fehlermöglichkeiten, die sich bei der Berechnung der spezifischen Extinktion summieren können. Wenn trotzdem die mittlere Abweichung nur 1% beträgt, so spricht das für eine außerordentliche Genauigkeit beider Verfahren.

Tabelle 10
Haltbarkeit einer Hb^+CN-Lösung

Datum	bei Zimmertemperatur Extinktion	bei 2°—4° C Extinktion
9. 5. 53	0,467	0,467
13. 7. 53	0,465	0,468
24. 9. 53	0,464	0,467
25. 8. 53	0,462	0,472

Am einfachsten durchzuführen und auch am genauesten ist die titanometrische Fe-Bestimmung, während die colorimetrische Mikroanalyse nur dann gleich gute Ergebnisse liefert, wenn man sehr viel Geduld aufwendet. Die Methoden zur Messung des Fe-o-Phenanthrolinkomplexes, die bisher benutzt wurden, waren nicht genau genug. Die Werte streuten zu stark. Die Farbintensität ist nämlich außer vom p_H-Wert entscheidend von der Salzkonzentration in der Lösung abhängig. Deshalb blieb keine andere Möglichkeit, als die Methode zu ändern, daß das Eisen ohne Störung zur Reaktion gelangte. Die Fällung des Fe mit Ammoniak und das Waschen des Niederschlages führte zu genauen Resultaten.

Als Hämoglobinstandard scheint eine Hämiglobincyanidlösung besondere Vorteile zu besitzen. Sie ist sehr leicht aus einer Hämoglobinlösung zu bereiten. Der geringfügige Zusatz der benötigten Reagentien, $K_3Fe(CN)_6$ und KCN ändert nicht die Extinktion. Sie ist außerdem weitgehend p_H-unabhängig. Lösungen dieser Substanz sind monatelang haltbar, in einem Kühlschrank wahrscheinlich mehrere Jahre, wie Drabkin (1946) zeigen konnte. Durch den Cyanid-Zusatz ist die Lösung vor Fäulnis geschützt.

Bei einem Vergleich einer aus Blut hergestellten Lösung mit einer Hämiglobincyanidstandardlösung könnte in vielen Fällen eine leichte Trübung der zu messenden Lösung störend sein. Solche Trübungen

verschwinden in alkalischer Reaktion. Es empfiehlt sich deshalb, die Messung bei einem p_H zwischen 9,0—9,5 vorzunehmen.

Durch eine Extinktionsmessung in einem Spektrophotometer läßt sich der Gesamthämoglobingehalt einfach, schnell und sehr genau bestimmen, so daß die umständlichen Verfahren der Gas- und Eisenanalyse überflüssig sind. Allerdings konnte in diesen Versuchen mit Pferdehämoglobin die spezifische Extinktion von Hb^+CN nicht sicher genug festgelegt werden, da die beiden verschiedenen Hb-Bestimmungen zu stark voneinander abweichen und die Ursache dafür nicht näher untersucht wurde. In einer weiteren Mitteilung wird über ähnliche Bestimmungen berichtet, in denen Hb^+CN-Lösungen aus menschlichem Blut bereitet wurden, das, wie gezeigt wird, zur Standardisierung vorzuziehen ist.

Zusammenfassung

Die spezifische Extinktion von Hämiglobincyanid (Hb^+CN), aus hämolysierten Pferdeblutkörperchen bereitet, betrug in 16 Untersuchungen $11{,}0 \pm 1{,}2\,\%$. Auf exakte Eisenbestimmungen wurde besonderer Wert gelegt. Am genauesten ist die Titration mit $TiCL_3$. Für die Messung des Eisens als o-Phenanthrolinkomplex wurde die übliche Methode modifiziert. Dadurch wurden bessere Resultate erzielt.

Die in der Warburg-Apparatur gemessene O_2-Menge entsprach nicht dem Fe-Gehalt des Pferdehämoglobins.

Hb^+CN-Lösungen sind sehr lange haltbar. Ihre Farbe ist über einen größeren Bereich unabhängig vom p_H. Die großen Vorteile von Hb^+CN zur Standardisierung von Hämoglobin werden erörtert.

Literatur

Barkan, G.: Biochem. Z. **283**, 241 (1936); **294**, 239 (1937). — Barkan, G., u. J. Olesk: Biochem. Z. **289**, 251 (1937). — Barron, E. S. G., R. Munch and A. E. Sidwell: Science (Lancaster, Pa.) **86**, 39 (1937). — Biltz, H.: Quantitative Analyse **1942**, S. 140. — Borei H.: Biochem. Z. **314**, 359 (1943). — Bruckmann, G., and Zondek: J. of Biol. Chem. **135**, 23 (1940). — Clegg, J. W., and E. J. King: Brit. Med. J. **1942** II, 329. — Drabkin, D. L.: J. of Biol. Chem. **140**, 387 (1941); **164**, 703 (1946). — Drabkin, D. L., and J. H. Austin: J. of Biol. Chem. **98**, 719 (1932); **112**, 51 (1935/36). — Evelyn, K. A., and H. T. Malloy: J. of Biol. Chem. **126**, 655 (1938). — Gibson, Q. H., and D. C. Harrison: Biochemic. J. **39**, 490 (1945). — Havemann, R.: Klin. Wschr. **1940**, 503. — Heilmeyer, L., u. A. Sundermann: Dtsch. Arch. klin. Med. **178**, 397 (1936). — Heilmeyer, L., u. K. Plötner: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit, 1937. — Heilmeyer, L., u. J. von Mutius: Dtsch. Arch. klin. Med. **182**, 164 (1938). — Hill, R.: Proc. Roy. Soc. (Lond.) B **114**, 213 (1930). — Kennedy, R.: J. of Biol. Chem. **74**, 385 (1927). — Kiese, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 385 (1947). — King, E. J., and M. Gilchrist: Lancet **1947** II, 201. — King, E. J., M. Gilchrist, I. D. P. Wooton u. a.: Lancet **1948** I, 478; Lancet **1948** II, 563. — Laurell, C.: Acta physiol. Scand. (Stockh.) **14**, 46 (1947). — Remmer, H., u. J. Meyer-Wilmes: Biochem. Z.; im Druck. — Sahli, H.: Lehrb. d. klin. Untersuchungsmethoden. S. 293. Leipzig 1914. — Schäfer, K.: Biochem. Z. **304**, 417 (1940). — Weise, H.: Biochem. Z. **293**, 64 (1937).

Dr. H. Remmer, Berlin-Dahlem, Pharmakolog. Institut der Freien Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 450—462 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die Standardisierung des roten Blutfarbstoffes durch Hämiglobincyanid

II. Mitteilung

Eisengehalt und O_2-Bindungsvermögen von menschlichem Blut

Von

HERBERT REMMER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 4. Juli 1956)

Die colorimetrische Messung des roten Blutfarbstoffes als Hämiglobincyanid (Hb + CN) bietet anderen Bestimmungsmethoden gegenüber erhebliche Vorteile (DRABKIN u. AUSTIN; EVELYN u. MALLOY; HAVEMANN; BETHKE u. SAVELSBERG; CHILCOTE u. O'DEA). Über die Verwendung dieses Farbstoffes zur Herstellung eines Hämoglobinstandards wurde bisher nur wenig diskutiert (DRABKIN; MCFARLANE, KING u. a.). Sowohl das reduzierte Hämoglobin (Hb), gleichgültig ob es frei oder beladen mit O_2 oder CO vorliegt, als auch Hämiglobin (Hb^+) werden durch Umsetzung mit Ferricyanid und KCN in einen einheitlichen Farbstoff überführt. Besonders vorteilhaft für eine spektrophotometrische Eichung einer solchen Lösung ist das breite Absorptionsmaximum von Hb^+CN im Grünen, ihre außerordentlich lange Haltbarkeit und die Unabhängigkeit ihrer Farbe vom p_H, worauf bereits in der Mitt. I (MEYER-WILMES u. REMMER) hingewiesen wurde. Aus dem Eisengehalt und der Lichtabsorption konnte sehr genau die spezifische Extinktion dieses Farbstoffes ermittelt werden. Diese Angabe ermöglicht eine Hämoglobinstandardisierung mittels einer einfachen spektrophotometrischen Messung, die sehr gut reproduzierbar ist. Eine größere Genauigkeit ist weder mit der Eisenanalyse noch mit der Messung der O_2- oder CO-Kapazität zu erzielen, die weit komplizierter und zeitraubender auszuführen sind. Allerdings ist die Voraussetzung für jenes leichte Meßverfahren der Besitz eines guten Spektralphotometers.

Zur Ausmessung der spezifischen Extinktion des Hb^+CN diente Pferdehämoglobin, das frei von Stromata durch Toluolhämolyse war und daher keine Trübungen aufwies (Mitteilung I, MEYER-WILMES u. REMMER). Aus kristallisiertem Pferdehämoglobin bereitetes Hb^+CN besaß die gleichen Eigenschaften. Leider stimmten Eisenanalyse und

O_2-Messung in der WARBURG-Apparatur nicht überein. Um diese Diskrepanz zu klären und um eine Grundlage zur Standardisierung von Menschenblutlösungen nach Umwandlung in Hb^+CN zu schaffen, wurden diese Untersuchungen noch einmal aufgegriffen. Dabei zeigte es sich, daß auch im menschlichen Blute das O_2- oder CO-Bindungsvermögen nicht dem Eisengehalte entsprach.

Methodik

Zur Bestimmung der Extinktion von Hämiglobincyanid wurde 1,0 ml Blut in einem 100,0 oder 250,0 ml-Meßkolben einpipettiert. Nachdem durch Zusatz von 20—50,0 ml H_2O eine Hämolyse erzielt war, wurde 1,0 ml einer 3%igen Ferricyanidlösung zugesetzt. In wenigen Minuten war eine völlige Umsetzung in Hämiglobin erreicht. Erst dann wurden 3 Tropfen einer 10% KCN-Lösung und 20,0 oder 50,0 ml Boratpuffer zugefügt. Mit H_2O wurde dann aufgefüllt. Der Boratpuffer enthielt 12,35 g Borsäure und 4 g NaOH auf 1000,0 ml. Der p_H-Wert der Lösung betrug etwa 9,2. Geringfügige Trübungen der Blutlösungen konnten im alkalischen Milieu vermindert oder völlig aufgehoben werden. Die Extinktion einer 1:100 verdünnten Blutlösung nahm durch Aufhellung folgendermaßen ab (Tab. 1). Allerdings ist Hämiglobincyanid nur bis zu einem p_H-Wert von 9,5 beständig (I. Mitteilung). Erhebliche Variation in der Ferricyanid- oder KCN-Konzentration hatte keinen Einfluß auf die Extinktion. Beide Substanzen mußten nur im Überschuß vorhanden sein (Tab. 2).

Tabelle 1

p_H	E	
6,8	0,926	(Phosphatpuffer)
9,1	0,919	(Boratpuffer)
9,6	0,912	(Boratpuffer)

Tabelle 2

Mol. Verhältnis		E
Ferricyanid / ¼ Hämogl.	KCN / ¼ Hb	Hb^+CN
5	25	0,920
14	75	0,918
46	75	0,918
70	75	0,918

Hämiglobin wurde mit der Methode nach HAVEMANN gemessen, wobei Blutlösung beliebig hoher Konzentration verwandt wurde. Da die Reaktion nur bei p_H 6,8 (Phosphatpuffer) zu messen ist, mußte unbedingt sorgfältig filtriert werden. Eine höhere Konzentration des Puffers ist nötig (etwa 2:5 m/15), da durch KCN-Zusatz eine Aufhellung der kolloidalen Lösung erfolgen kann, wenn sich der p_H-Wert zum Alkalischen hin verschiebt.

Das dreiwertige Eisen des veraschten Blutes wurde mit Titantrichlorid titriert, wie es in Mitteilung I beschrieben wurde. Die zu veraschende Blutmenge muß mindestens 1 mg Fe enthalten. Kleinere Eisenmengen liefern zu niedrige Werte. Für genaue Analysen sind deshalb

3,0—5,0 ml Blut zu verwenden. Besonderer Wert wurde auf eine sorgfältige Veraschung und eine äußerst genau eingestellte Eisenstandardlösung gelegt, um Fehler soweit wie möglich zu vermeiden.

Die aus Ferriammoniumsulfat bereitete n/10-Lösung wurde nach 4 verschiedenen Methoden titriert:

a) mit $K_2Cr_2O_7$ nach Reduktion im Cadmiumreductor (vgl. Medicus);

b) mit $KMnO_4$, nach Reinhardt-Zimmermann, reduziert mit Stannochlorid (vgl. Biltz);

c) mit Cerisulfat nach Reduktion, wie unter a) angegeben;

d) mit Komplexon, wie unten näher beschrieben wird.

Die gravimetrischen Eisenbestimmungen waren nicht verwertbar, da sie um 1—1,5% höher waren. Die jodometrische Eisenanalyse lieferte Werte, die zu stark schwankten, so daß sie nicht berücksichtigt wurden. 10,0 ml der Standardlösung enthielten nach Methode a) 55,60, nach b) 55,38, nach c) 55,40 und nach d) 55,35 mg Eisen.

Im Laufe der Untersuchungen wurde die einfache Methode der Bestimmung des Fe^{III} mit Hilfe von Komplexon III (Tetraessigsäurediaminoäthylen) bekannt. Diese Verbindung kann sehr gut eingewogen und direkt zur Titration benutzt werden. In saurer Lösung erfolgt eine komplexe stöchiometrische Bindung des dreiwertigen Eisens, wobei andere Kationen nicht stören (Schwarzenbach u. Willi). Häberli titrierte nach feuchter Veraschung des Blutes das Fe^{III}. Diese Methode lieferte Werte, die zu stark streuten, deshalb wurde das eigene Veraschungsverfahren beibehalten.

Die veraschte Substanz von 2,0 ml Blut wurde in der gleichen Menge HCl gelöst. Mit konzentrierter und verdünnter Natronlauge wurde dann vorsichtig neutralisiert, bis Eisenhydroxyd gerade auszufällen begann und anschließend durch Zusatz von 2,0 ml eines HCl-KCl-Puffers nach Clark u. Lubs (vgl. D'Ans u. Lax) ein p_H von etwa 2,0 eingestellt. Als Indicator diente eine 2% Sulfosalicylsäurelösung, von der 3 Tropfen hinzugesetzt wurden. Nach Erwärmung auf etwa 50° C wurde mit 0,01 molarer Komplexonlösung titriert. Wenn die rötliche Farbe in der Nähe des Endpunktes abblaßt, mußte nochmals erwärmt werden. Die Fe^{III}-Lösungen ließen sich sehr genau titrieren. Die mittlere Abweichung bei 6 Bestimmungen von je 5 ml n/100 Eisenstandardlösung betrug nur $\pm$ 0,25%. Diese Methode war aber noch nicht mit der gleichen Genauigkeit wie die Fe-Analyse mit $TiCl_3$ auszuführen, da es schwieriger war, den Farbumschlagspunkt genau zu erfassen. Weitere Erfahrungen werden über ihre Brauchbarkeit entscheiden.

Vor jeder gasometrischen Bestimmung wurde etwa 5,0 ml Blut in einer 250,0 ml fassenden und waagerecht liegenden Flasche mindestens

½ Std rotiert, um eine maximale Sättigung zu gewährleisten. Überraschenderweise lieferte die O_2-Messung in der WARBURG-Apparatur sehr niedrige und erheblich streuende Werte (Tab. 4, Nr. 5 und 6). Abweichungen dieser Art wurden bei Messungen von gereinigten Pferdehämoglobinlösungen (Mitteilung I) niemals beobachtet. Während der Messung, sowohl vor als auch nach Zusatz von Ferricyanid, wurde laufend

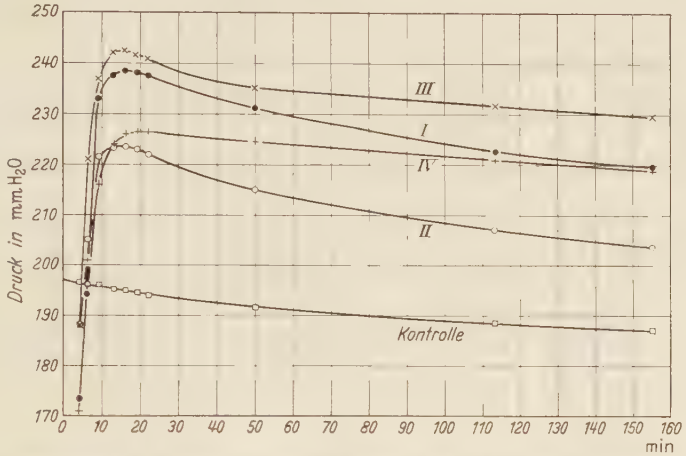


Abb. 1. Gasabsorption in WARBURG-Gefäßen bei Messung des O_2-Bindungsvermögen von hämolysiertem Menschenblut. Im Zeitpunkt 0 Zusatz von $K_3[Fe(CN)_6]$. Temperatur: 24° C. *Versuchsansatz:* 1,0 Blut, 1,0 Saponin-Lösung 2%, im Einsatz 0,2 KOH 10%, in der Birne 0,2 $K_3[Fe(CN)_6]$ 20%

Gas absorbiert. Die Druckabnahme schwankte in den einzelnen Gefäßen erheblich (Abb. 1). Auf diese störende Gasabsorption machten bereits KING u. Mitarb. aufmerksam, ohne einen Grund dafür anzugeben. Sehr wahrscheinlich geht auch im Blute nach Hämolyse die Atmung weiter. BIRD ermittelte in einer großeren Zahl von Versuchen die durchschnittliche O_2-Aufnahme des menschlichen Blutes und fand für 1,0 ml 42,6 mm^3/Std (Min.: 28, Max.: 62). Berücksichtigt man, daß dieser Wert für eine

Tabelle 3

		Hämoglobingehalt in 10^{-6} Mol		Gasabsorption mm^3/Std
		nicht korrigiert	korrigiert	
Menschenblut	Versuch 5	9,70	9,84	5—12
	Versuch 6	8,50	8,72	16—24
Pferdehämoglobin aus gewaschenen Erythrocyten	krist.	2,55		0
	Mutterlauge a	3,35	3,55	14
	Mutterlauge b	3,70	3,95	18
	Toluolhämolyse	5,97		0

Tabelle 4

	E Hb^+CN 1,0 ml Blut Verd. 1:100	Fe-Bestimmung 1,0 ml Blut				gasometrisch nach van Slyke 1,0 ml Blut				Hämiglobin
		$TiCl_3$		Komplexon		O_2-Bestimmung		CO-Bestimmung		
		10^{-6} Mol	ε mMol/1	10^{-6} Mol	ε mMol/1	10^{-6} Mol	ε mMol/1	10^{-6} Mol	ε mMol/1	%
1 Tha	0,820 0,828	7,50	11,0							—
2 I Ra	0,790	7,22 7,23	10,95							—
3 W. A.	0,996 0,996	9,00	11,05							—
4 L	1,155 1,170	10,50 10,52	11,05	10,40	11,15					—
								O_2-Freisetzung gem. in Warburg-App.		
								10^{-6} Mol	ε	
5 H. R. a	1,120 1,115	10,17	10,95			9,78 9,79 9,77	11,45	9,84 9,82 9,62 10,08	11,35	>0,5
6 Th. b	1,028	9,28 9,28	11,10			8,98 8,93	11,50	8,57 8,72 8,83 8,88	11,75	>0,5

Tabelle 4 (Fortsetzung)

7 Sch.	1,123 1,10	9,80 9,92	11,25			9,68 9,81	11,40			>0,5
8 I. R. b	0,925 0,930	8,40 8,40	11,05	8,35	11,10	7,95 8,02 7,90[1] 8,10[1]	11,60	8,28[2] 8,17[2]	11,25	1,3
9 Ra	1,025	9,14 9,14	11,20	9,20 9,15	11,15	9,20 9,20	11,15	9,15 9,15	11,20	0,8
10 W. B.	0,647 0,641	5,69 5,75	11,25			5,70 5,70 5,75	11,25	5,86 5,85	11,0	—
11 H. R. b	1,082	9,65 9,65	11,20			9,60 9,60	11,30	9,60 9,60	11,30	>0,5
12 W. C.	0,863			7,60	11,35	7,49 7,49	11,50	7,53 7,57	11,45	>0,5
13 W. D.	0,900 0,900					7,88	11,40	7,95 7,90	11,35	>0,5
14 W. E.	0,750					6,50 6,50	11,55			>0,5
15 Mai a	1,250					10,88 11,08	11,35			3,0
16 Me	0,930					8,25	11,25	8,30 8,25	11,25	>0,5
17 Dr.	1,128					10,05 10,05	11,20	10,00 9,95	11,30	1,3

[1] Gesättigt mit O_2 (760 mm Hg) [2] Gesättigt mit CO (760 mm Hg)

Tabelle 4 (Fortsetzung)

	E Hb·CN 1,0 ml Blut Verd. 1:100	Fe-Bestimmung 1,0 ml Blut				gasometrisch nach VAN SLYKE 1,0 ml Blut				Hämiglobin
		$TiCl_3$		Komplexon		O_2-Bestimmung		CO-Bestimmung		
		10^{-6} Mol	ε mMol/1	10^{-6} Mol	ε mMol/1	10^{-6} Mol	ε mMol/1	10^{-6} Mol	ε mMol/1	%
18 Hü	1,220					10,76 10,71	11,35	10,64 10,64	11,45	2,1
19 H. R. c	1,120					10,00 10,10	11,15			0,3
20 W. F.	0,783					6,79 6,89	11,45			1,4
21 H. R. d	1,100					9,69[1] 9,68 9,60 9,61[1]	11,40	9,88[2] 9,84[2]	11,15	1,6
22 Mai b	1,190					10,50 10,55 10,60 10,56	11,30			0,2
Mittelwert ε		1,09		11,19		11,36		11,27		
mittlere Abweichung		$\pm$0,11		$\pm$0,13		$\pm$0,14		$\pm$0,14		
		$\pm$ 1%		$\pm$1,1%		$\pm$1,2%		$\pm$1,2%		
n		11		4		18		10		
Mittelwert ε		11,12 (n = 15)				11,33 (n = 28)				
mittlere Abweichung in %		$\pm$1,1%				$\pm$1,25%				
$\frac{\Delta\,(11{,}33-11{,}12)}{\sqrt{\varepsilon_1^2+\varepsilon_2^2}}$		$\frac{0{,}21}{0{,}042} = 5{,}0$								

Temperatur von 37° C gilt, während die eigenen Versuche bei 24° C erfolgten, so reichen die gemessenen Gasabsorptionen an diesen Wert heran (Tab. 3).

Ein weiterer Beweis für die Atmung des Blutes ist die Tatsache, daß kristallisiertes Pferdehämoglobin, nach H_2O-Hämolyse gewonnen, im Gegensatz zur Mutterlauge O_2 nicht absorbierte. Das gleiche Verhalten zeigte das durch Toluolhämolyse bereitete Hämoglobin.

Die Genauigkeit der WARBURG-Methode leidet sehr durch die Korrektur der Meßwerte, die, wie Tab. 3 und 4 zeigt, erheblich streuen können. Daher wurde für gasometrische Bestimmungen ausschließlich die Methoden nach VAN SLYKE benutzt.

Die Sauerstoffkapazität des Blutes wurde nach dem Verfahren von VAN SLYKE u. NEILL gemessen. Da die Freisetzung der Gase auch bei hoher Schüttelgeschwindigkeit mehr als 5 min dauerte, wurde ein Acetatpuffer hinzugegeben, so daß die Reaktion bei p_H 6 ablief. Das Reagens hatte folgende Zusammensetzung: 0,1 Essigsäure, 1,9 Natriumacetat, 0,3 Kaliumferricyanid, 0,3 Octylalkohol, 0,3 Saponin und ad 100,0 Aqua dest. Das im Blute physikalische gelöste O_2 und N_2 wurde nach den Angaben von SENDROY, DILLON u. VAN SLYKE und von VAN SLYKE, DILLON u. MARGARIA korrigiert.

Zur Bestimmung der CO-Kapazität wurde die Methode nach VAN SLYKE u. HILLER benutzt. Nur die zugesetzten Reagentien wurden in Anlehnung an eine spätere Modifikation dieser Methode (VAN SLYKE, HILLER, WEISIGER u. CRUZ) etwas geändert, da die ursprünglich vorhandene Milchsäure das Hämoglobin ausfällte und dadurch die Ablesung der Meßwerte störte. Außerdem dauerte die Hämolyse nach Einfüllen von 1,0 ml Blut und 2,5 ml H_2O zu lange. Deshalb wurde Saponin dem Wasser zugesetzt. Die Milchsäure wurde wieder durch Acetatpuffer ersetzt. Folgende Reagentien wurden nacheinander eingefüllt. 1. 2 Tropfen Octylalkohol, 2. 1,0 ml Blut. 3. 2,4 ml 2%-Saponinlösung. 4. etwa 2,5 ml CO Gas unter Atmosphärendruck, 5. 0,2 ml Reagens folgender Zusammensetzung: 20 g $K_3Fe(CN)_6$, 25 g Natriumacetat, 2 g Essigsäure, ad 100,0 Aqua dest. Der abzuziehende Leerwert entsprach unter diesen Bedingungen einem Druck von 0,45 cm Hg.

Bei allen Untersuchungen wurden geeichte Pipetten verwendet.

Ergebnis und Diskussion

In einzelnen Blutanalysen ist es sehr schwierig, Differenzen zwischen dem Eisengehalt und der O_2- oder CO-Kapazität festzustellen. Die Unterschiede liegen im Bereich der Meßfehler, wenn nicht sehr exakte Methoden benutzt werden. In 8 Blutproben (Nr. 5—12, Tab. 4) wurde der Hämoglobingehalt nach beiden Verfahren bestimmt. 6 davon hatten einen um 0,5—4% höheren Eisengehalt als es der O_2- oder CO-Kapazität

entsprach. Die Frage blieb offen, ob es sich dabei um wirkliche Differenzen handelt. Dadurch, daß in den vorliegenden Untersuchungen sowohl der Fe-Gehalt als auch das Gasbindungsvermögen auf die gleiche Größe, nämlich die Extinktion der Blutlösung nach Umwandlung im Hämiglobincyanid, bezogen wurden, war es möglich, insgesamt 22 Blutproben auszuwerten. Die Mittelwerte der spezifischen Extinktionen, die aus den Ergebnissen der verschiedenen Verfahren errechnet wurden, differierten um 2—2,5%. In diesem Unterschied kommt die Tatsache zum Ausdruck, daß die Eisenanalyse Ergebnisse lieferte, die durchschnittlich um 2,0 bis 2,5% höher lagen als die Resultate der gasometrischen Bestimmungen. Die mittleren Abweichungen der Werte und damit auch die Meßfehler der einzelnen Methoden sind so niedrig, daß der Unterschied tatsächlich signifikant ist.

Seit langem wird über die Frage diskutiert, ob im Blute der Eisengehalt dem O_2-Bindungsvermögen entspricht. Da die beobachteten Differenzen in die Fehlerbreite der Methodik fielen, wurde bis vor wenigen Jahren fast ausschließlich die Ansicht vertreten, daß zwischen beiden Größen im Blute eine ganz genaue stöchiometrische Beziehung besteht. Diese Meinung geht aus von den ersten ausgezeichneten Untersuchungen von Hüfner, die später von Barcroft u. Burn und auch Peters bestätigt wurden. Eine erschöpfende Übersicht über die ältere Literatur gab Liljestrand. Neuere Arbeiten bestätigen diese Ergebnisse (Helmer u. Emerson, Weise, Heilmeyer u. Sundermann und Ramsay). Gegen diese Ansicht sprechen Untersuchungen von Gibson u. Harrison, die 3% mehr Eisen fanden, und von King, Gilchrist u. Mitarb., die sehr genaue Analysen in 4 verschiedenen englischen Instituten durchführten und im Durchschnitt Abweichungen von 2% beobachteten. Die eigenen, Befunde bestätigen diese Ergebnisse. Wie kann man eine Differenz von 2,0—2,5% erklären? Das Serumeisen macht nur 0,2, höchstens 0,3% des Gesamteisens aus und fällt daher nicht ins Gewicht. Es kann kein Zweifel darüber bestehen, daß neben dem roten Blutfarbstoff inaktive eisenhaltige Verbindungen vorhanden sind. Die ersten Messungen von Hämiglobin fielen wegen methodischer Fehler zu hoch aus (Heubner). Sehr genaue Analysen ergaben, daß im Durchschnitt 0,7% des gesamten Blutfarbstoffes als Hämiglobin vorliegen (Heubner, Kiese, Stuhlmann u. Schwartzkoff-Jung). Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Paul u. Kemp. Sie fanden 0,6%, während van Slyke, Hiller, Weisiger u. Cruz noch niedrigere Werte beobachteten, im Durchschnitt nur 0,36%. Auch die eigenen Befunde bestätigen, daß von 17 Blutproben 10 einen Hämiglobingehalt aufwiesen, der noch nicht einmal 0,5% erreichte. Auch die beste Analyse kann gewisse methodische Fehler nicht ausschließen, so daß es sehr schwierig ist, noch genauere Zahlen anzugeben.

Der Hämiglobingehalt allein erklärt nicht die Differenz zwischen Fe-Bestimmung und Gasanalyse. Schwieriger ist der quantitative Nachweis anderer inaktiver Blutfarbstoffe. AMMUNDSEN fand erhebliche Unterschiede in der CO-Kapazität des Blutes vor und nach Reduktion mit Natriumdithionit. Im Durchschnitt betrug die Differenz 3,0%. Dieses Ergebnis wurde von KALLNER bestritten. In sehr exakten Untersuchungen wiesen dann VAN SLYKE u. Mitarb. (1946) nach, daß neben dem Hämiglobin noch kleine Mengen anderer Farbstoffe vorliegen, die wie Hämiglobin nach Reduktion CO zu binden vermögen. Sofort nach Blutentnahme ließen sich solche inaktiven Blutfarbstoffe nachweisen. Merkwürdigerweise nahm ihr Anteil von 1,3% ab, wenn die Blutproben 2—4 Std standen, und erreichte fast den colorimetrisch gemessenen Hämiglobingehalt von 0,36%. Dieses Verhalten blieb ungeklärt. Sicherlich sind aber neben Hämiglobin Hämiglobinderivate im Blute vorhanden, die den Gallenfarbstoffen nahe stehen.

KIESE, der diese grünen Farbstoffe näher studierte und ihnen den Namen Verdoglobin gab, fand im menschlichen Blute einen Anteil von 0,4%. Einen weiteren Hinweis bieten die Untersuchungen von BARKAN, der berichtete, daß ein beträchtlicher Teil des Bluteisens (4—6%) in einer durch Essigsäure abspaltbaren Form vorliegt. In Gegenwart von CO sinkt dieser Anteil auf etwa 1,5% ab (BARKAN). LEMBERG u. LEGGE nehmen an, daß diese Eisenfraktion aus dem von ihnen beschriebenen Choleglobin, welches Kiese Verdoglobin A nennt, stammt und daß der größere Anteil des leicht abspaltbaren Eisens ein Kunstprodukt ist.

Sollten weitere Untersuchungen ebenfalls diese Differenz zwischen Eisengehalt und O_2- oder CO-Kapazität bestätigen, dann wird es keinen Zweifel mehr darüber geben, daß neben dem Hämiglobin ein noch unbekanntes eisenhaltiges Abbauprodukt, den Gallenfarbstoffen nahestehend, als Hauptanteil zu der Fraktion des sogenannten inaktiven Blutfarbstoffes gehört.

Auch die vorliegenden Untersuchungen beweisen die ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Absorptionsmessungen von Hämiglobincyanid. Obwohl in jede Bestimmung der spezifischen Extinktion der Fehler von 2 verschiedenen Messungen eingeht, betrug die mittlere Abweichung nur 1,0—1,3% (Tab. 4). Der Fehler der spektrophotometrischen Messung allein ist wesentlich geringer und beträgt nach eigenen Erfahrungen etwa 0,5%. Die gute Übereinstimmung der Extinktionskoeffizienten von Hb^+CN (Tab. 5) beweist, daß es gleichgültig ist, ob man von hämolysiertem Menschenblut oder aber von gereinigten Pferdehämoglobinlösungen, die frei von Stromata sind, ausgeht, wenn, wie es beim Menschenblut geschehen ist, die Messung von Hb^+CN im schwach alkalischen Milieu (p_H 9,2) erfolgt, wobei die Trübungen weitgehend beseitigt werden.

Welche Hämoglobinanalyse soll man bei der Bestimmung der spezifischen Extinktion zugrunde legen? Bei Untersuchungen von Menschenblut beträgt die Differenz 2%, bei Verwendung von Pferdehämoglobin sogar 3,5% (Mitteilung I und Tab. 5). King und seine Mitarbeiter gelangten zu einem ähnlichen Ergebnis. Die beiden Analysen von Menschenblut unterschieden sich um 2%, von Schweineblut um 3,5%.

Drabkin u. Austin (1932, 1935—36), Drabkin (1941, 1946) und Drabkin u. Schmidt, die Gesamthämoglobin als Hb^+CN bestimmten, bezogen die Meßwerte auf eine spezifische Extinktion von 11,5. Diesen

Tabelle 5

	Hb-Bestimmungsmethode			
	Fe-Analyse		Gasometr. Mess.	
	Pferde-Hb[1]	Menschenblut	Pferde-Hb[1]	Menschenblut
Hb^+CN	11,0	11,12	11,38	11,33
%	1,1	1,1	1,0	1,25
n	24	15	17	27

[1] Siehe Mitteilung I (Meyer-Wilms und Remmer).

Wert ermittelten sie aus Messungen der O_2-Kapazität von Hundeblut. Der geringe Unterschied zwischen dieser Konstante und der eigenen (11,35) beruht vermutlich darauf, daß die Untersucher leichte Trübungen bei Messung in neutraler Reaktion in Kauf nahmen, welche die Extinktion etwas erhöhten. Möglicherweise verhält sich Hundeblut auch anders als Menschenblut.

Die Ergebnisse zeigen die Brauchbarkeit der Hb^+CN-Methode nicht nur zu Hämoglobinbestimmungen, sondern auch zur Hämoglobinstandardisierung. Dieses Verfahren ist deshalb anderen überlegen, weil eine einfache spektrophotometrische Messung zu sehr genauen Bestimmung des Hb-Gehaltes genügt. Es ist ohne Zweifel sicherer als die komplizierte Eisenanalyse oder die genau so zeitraubende Gasmessung, welche nur in den Händen von geübten Untersuchern genauere Werte liefern können. Die Voraussetzung für eine exakte Eichung ist allerdings ein gutes Spektrophotometer. Dabei übt die Spaltbreite des Monochromators keinen Einfluß auf die Messung aus, wie bei Bestimmung von O_2H oder COHb, da Hb^+CN ein sehr breites Absorptionsmaximum besitzt.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist darin zu sehen, daß die Farbe von solchen Lösungen weitgehend unabhängig von der Menge der zugesetzten Reagentien und von der vorhandenen Wasserstoffionenkonzentration ist. Auch wegen der außerordentlich langen Haltbarkeit

der Hb·CN-Lösungen (Meyer-Wilmes u. Remmer) ist dieses Verfahren anderen überlegen.

Auf Extinktionsmessungen von HbO_2 zur Hämoglobinstandardisierung, wie sie auf Vorschlag von Heilmeyer u. Sundermann eine Kommission der deutschen Gesellschaft für innere Medizin 1935 empfahl, sollte man endgültig verzichten und dafür die Messung von Hämiglobincyanid jeder Eichung von Hämometern zugrunde legen.

Zusammenfassung

Der Eisengehalt des menschlichen Blutes ist 2% höher als es dem O_2- oder CO-Bindungsvermögen entspricht. An Hämiglobin enthält der Blutfarbstoff rund 0,5%. Die restliche Differenz von 1,5% beruht wahrscheinlich auf dem Vorhandensein „inaktiver" eisenhaltiger Blutfarbstoffe.

Hämiglobincyanid wurde nach Umwandlung von hämolysiertem menschlichen Blute bei einem p_H von 9,2 spektrophotometrisch gemessen. Die spezifische Extinktion betrug, bezogen auf die Eisenanalyse 11,1 auf die O_2-Bestimmung 11,35.

Die Messung des Blutfarbstoffes als Hämiglobincyanid eignet sich vorzüglich zur Standardisierung von Hämoglobinlösungen, Die Vorteile die es anderen Methoden gegenüber besitzt, werden diskutiert.

Hern Chem. Ing. Ramstetter sei für seine Hilfe bei den Eisenanalysen gedankt.

Literatur

Ammundsen, E.: J. of Biol. Chem. **138**, 563 (1941). — Barcroft, J., and J. H. Burn: J. of Physiol. **45**, 493 (1913). — Barkan, G., u. E. Berger: Archiv exper. Path. u. Pharmakol. **136**, 278 (1928). — Betke, K., u. W. Savelsberg: Biochem. Z. **320**, 431 (1950). — Biltz, H.: Quantitative Analyse 1942. — Bird, R. M.: J. of Biol. Chem. **169**, 493 (1947). — Chilcote, M. E., and A. E. O'Dea: J. of Biol. Chem. **200**, 117 (1953). — D'Ans, J., u. E. Lax: Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Berlin 1943. — Drabkin, D. L.: J. of Biol. Chem. **140**, 373, 387 (1941); **164**, 703 (1946). — Drabkin, D. L., and J. H. Austin: J. of Biol. Chem. **98**, 719 (1932); **112**, 51 (1935—1936). — Drabkin, D. L., and C. F. Schmidt: J. of Biol. Chem. **157**, 69 (1945). — Evelyn, K. A., and H. T. Malloy: J. of Biol. Chem. **126**, 655 (1938). — Gibson, Q. H., and D. C. Harrison: Biochemic. J. **39**, 490 (1945). — Häberli, E.: Experientia (Basel) **10**, 34 (1954). — Havemann, R.: Klin. Wschr. **1940**, 503. — Heilmeyer, L., u. A. Sundermann: Dtsch. Arch. klin. Med. **178**, 397 (1936). — Helmer, O. M., and C. R. Emerson: J. of Biol. Chem. **104**, 157 (1934). — Heubner, W.: Ergebnisse der Physiologie **43**, 18—19 (1940). — Heubner, W., M. Kiese, M. Stuhlmann u. W. Schwartzkoff-Jung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 313 (1947). — Hüfner, G.: Arch. f. Physiol. **1894**, 130. — Kallner, S.: J. of Physiol. **104**, 6 (1945). — Kiese, M.: Klin. Wschr. **1942**, 565. — Kiese, M., u. H. Kaeske: Biochem. Z. **312**, 121 (1942). — King, E. J., M. Gilchrist, I. D. Wooton u. a.: Lancet **1948**, I 478. — Legge, J. W., and R. Lemberg: Biochemic. J. **35**, 353 (1941). — Liljestrand, G.: Handbuch d. norm. u. pathol. Physiol. VI 1, 444 (1928). — McFarlane, R. G., E. J. King, I. D. Wooton and

M. Gilchrist: Lancet **1948**, I, 282. — Medicus, L.: Kurze Anleitung zur Maßanalyse. Dresden, Leipzig 1947. — Meyer-Wilmes, J., u. H. Remmer: Mitt. I. — Paul, W. D., and C. R. Kemp: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **56**, 55 (1944). — Peters, R. A.: J. of Physiol. **44**, 131 (1912). — Ramsay, W. N.: Biochemic. J. **40**. 286 (1946). — Remmer, H., u. J. Meyer-Wilmes: Biochem. Z. (im Druck). — Schwarzenbach, G., u. A. Willi: Helvet. chim. Acta **34**, 528 (1951). — Sendroy, J., R. T. Dillon and D. D. van Slyke: J. of Biol. Chem. **105**, 597 (1934). — van Slyke, D. D., R. T. Dillon and R. Margaria: J. of Biol. Chem. **105**, 571 (1934). — Slyke, D. D. van, and A. Hiller: J. of Biol. Chem. **78**, 807 (1928). — van Slyke, D. D., A. Hiller, J. R. Weisiger and W. O. Cruz: J. of Biol. Chem. **166**, 121 (1946). — Slyke, D. D. van, and J. M. Neill: J. of Biol. Chem. **61**, 523 (1924). — Weise, H.: Biochem. Z. **293**, 64 (1937).

Dr. H. Remmer, Berlin-Dahlem, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 463—468 (1956)

Aus der Pathophysiologischen Abteilung des „Korányi"-Landesinstituts für Tuberkulose

Ausbildung bedingter Reflexe während Morphingewöhnung

Von
Endre Komlós und István Földes

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 23. Juli 1956)

Unseres Wissens gelang es bisher auf folgende Morphinwirkungen bedingte Reflexe auszubilden: Speichelfluß, Erbrechen, EKG-Störungen, Atmungsänderungen und depressive Wirkungen (Krylow, Sborowskaja, Sborowskaja-Dolin, Delov). Diese Ergebnisse sind um so bemerkenswerter, als die Euphorie, Schlaf, Atemlähmung und Erbrechen erregenden Wirkungen des Morphins während der Gewöhnung sehr rasch nachlassen und nur bei den Vagus und Occulomotorius tonussteigernden, sowie das Brechzentrum lähmenden Wirkungen keine Gewöhnung nachzuweisen ist.

Auch kann man im Verlauf der Gewöhnung am Anfang Abnahme der Erregbarkeit, Somnolenz, beobachten, welche mit der Zeit in eine Steigerung übergeht (Seevers). Die Wirkung von Morphin ändert sich also während der Gewöhnung quantitativ und qualitativ. Diese Änderung kann nur mit der infolge der Gewöhnung veränderten Reaktivität des Organismus in Zusammenhang stehen.

In vorliegenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob es möglich ist, bedingte Reflexe auf eine neue, während der Gewöhnung entstandene Wirkung des Morphins auszubilden. Wir untersuchten auch, ob sich bedingte Reflexe auf die Darmwirkung des Morphins ausbilden, da bei dieser auch periphere Angriffspunkte angenommen wurden.

Methodik

Zu unseren Versuchen verwendeten wir 100—200 g schwere, in unserem Institut gezüchtete weiße Ratten beiderlei Geschlechts. Zur Morphingewöhnung wurde den Tieren täglich 10 mg/kg Morphinum hydrochloricum s. c. verabfolgt. Wir steigerten die Dosis während der Gewöhnungsdauer nicht. Unter diesen Umständen zeigte diese Morphindosis am 10.—14. Tag keine analgetische Wirkung mehr, während zur selben Zeit nach der Injektion eine bedeutende Motilitätssteigerung auftrat.

Die lokomotorischen Reaktionen wurden mit der Methode von Komlós u. Mitarb. gemessen. Das Wesen dieser Methode besteht darin, daß die Bewegung eines Zitterkäfigs auf ein pneumatisches System übertragen wird, aus welchem eine der Bewegung proportionale Wassermenge (Milliliter) entfließt.

Um die durch die Orientierungsreaktion verursachten Bewegungen bei der Messung auszuschalten, begannen wir mit der Registrierung 20 min nach Einsetzung der Tiere in den Zitterkäfig. Nach 1 Std bestimmten wir die ausgeflossene Wassermenge, welche wir als „Ruhewert" bezeichnen. Danach wurde den Tieren die entsprechende Dosis Morphin bzw. phys. NaCl verabfolgt, sie wurden in den Käfig zurückgesetzt und nach einer Pause von 5 min (die Orientierungsreaktionen sind dann nämlich entsprechend kürzer) die Registrierung des ausfließenden Wassers während einer weiteren Stunde fortgesetzt.

Die Darmwirkung des Morphins untersuchten wir auf folgende Weise: wir hielten unsere Ratten in Käfigen, durch deren Boden die Faecesstücke frei abfallen konnten. Die Tiere wurden in Gruppen von je 10 gleich schweren Ratten eingeteilt. Die Gruppen wurden unter denselben Umständen gehalten und erhielten die gleiche Nahrung immer einmal täglich 1 Std vor der Injektion. Die Morphingewöhnung wurde in der oben geschilderten Weise vorgenommen; die Kontrollgruppe bekam statt Morphin phys. NaCl-Lösung s. c. Danach bestimmten wir die Zahl der Faeceskügelchen, welche die Ratten in 5 Std nach der Injektion entleerten. Der leichteren Übersichtlichkeit halber drückten wir die Zahl der Faeceskügelchen der mit Morphin behandelten Gruppe in Prozent der Kontrollgruppe aus. Vor Beginn unserer Experimente untersuchten wir, wie weit die Anzahl der Faeceskügelchen zweier gleichgroßer, unter gleichen Bedingungen gehaltener Gruppen voneinander abweicht. Der Unterschied betrug — für einen Durchschnitt von 10 Tagen — nicht mehr als $\pm$ 5%.

Ergebnisse und Besprechung

Zuerst bestimmten wir die Werte der Bewegungsmenge unbehandelter Ratten vor und nach phys. NaCl-Injektionen. Wie aus der entsprechenden Rubrik der Tab. 1 ersichtlich ist, waren die „Ruhewerte" von 10 Tieren im Durchschnitt 692 $\pm$ 189 ml, nach der Injektion hingegen 502 $\pm$ 153 ml. Dem Studentschen „t"-Verfahren gemäß ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Man kann also feststellen, daß unbehandelte Tiere sich in der zweiten Stunde des Versuches weniger bewegen als in der ersten.

10 Tiere gewöhnten wir an Morphin. Die lokomotorischen Untersuchungen führten wir zwischen dem 60. und 80. Tag der Morphinbehandlung durch. Wie aus der entsprechenden Rubrik der Tab. 1 hervorgeht, waren die „Ruhewerte" der gewöhnten Tiere 1183 $\pm$ 210 ml, nach der Morphinverabfolgung jedoch 2345 $\pm$ 685 ml. Der Unterschied dieser zwei Werte ist — nach dem gleichen Verfahren berechnet — statistisch signifikant. Ein anderer signifikanter Unterschied besteht zwischen den „Ruhewerten" der unbehandelten und der gewöhnten Tiere. Es läßt sich also feststellen, daß 1. die Motilität der morphingewöhnten Tiere auf die Wirkung der Morphininjektion beträchtlich zunimmt und daß 2. auch die „Ruhemotilität" der morphingewöhnten Tiere größer ist als jene der unbehandelten Tiere.

Die Frage, ob die gesteigerte Motilität, welche sich während der Gewöhnung an Morphin ausbildet, auch als die Wirkung bedingter Reize entsteht, untersuchten wir folgendermaßen: am 5.—20. Tag nach Beendigung der Morphinbehandlung bestimmten wir erneut die „Ruhewerte" der Tiere und verabfolgten ihnen dann statt Morphin phys. NaCl-Lösung. Wie aus der entsprechenden Rubrik der Tab. 1 ersichtlich ist, war der „Ruhewert" 729 ± 183 ml, nach der phys. NaCl-Injektion hingegen 1703 ± 721 ml. Auch dieser Unterschied ist statistisch signifikant.

In einigen Versuchen fanden wir, daß in dieser Periode auch Morphinverabfolgung eine Steigerung der Motilität verursacht, trotzdem in dieser Periode die analgetische Wirkung des Morphins wieder erscheint.

Tabelle 1

Die Bewegungsmenge in Milliliter ausgedrückt

Unbehandelte Tiere		Morphin gewöhnte Tiere		Morphin gewöhnte Tiere	
Ruhewert	Nach NaCl-Verabfolgung	Ruhewert	Nach 10 mg Morphin-Verabfolgung	Ruhewert	Nach NaCl-Verabfolgung
965	775	860	1780	1060	2720
1105	750	1370	3635	580	2345
575	560	1100	2270	670	1750
640	480	1480	3460	480	2950
585	475	1255	2575	675	1050
610	310	800	1865	585	1980
540	410	1230	1555	790	1055
555	460	1400	2165	685	1045
660	380	1110	1645	1055	955
680	420	1225	2500	705	1180
692 ± 189	502 ± 153	1183 ± 210	2345 ± 685	729 ± 183	1703 ± 721
$t = 5{,}89$		$t = 6{,}2$		$t = 3{,}721$	
$p < 0{,}1\%$		$p < 0{,}1\%$		$p < 0{,}1\%$	

Betreffend die Ruhewerte der unbehandelten und gewöhnten Tiere: $t = 5{,}231$, $p < 0{,}1\%$

Seevers und andere Autoren sind der Meinung, daß Morphin bei Ratten primär excitatorisch wirkt und daher Gewöhnung nur schwer und mit sehr großen Dosen erreichbar ist. Laut Mavrojannis hingegen entsteht nach Verabfolgung von 10 bis 15 mg Morphin bei Ratten ein 4—5 Std lang dauernder kataleptischer Zustand. Auch größere Dosen (0,03—0,04) verursachen Tod ohne Krämpfe, dem ein 4 bis 5stündiger kataleptischer Zustand vorausgeht.

Unsere eigenen Erfahrungen zeigten, daß im Falle entsprechender Dosen (10 mg/kg) bei den 1.—3. Behandlungen ausgesprochene depressive Symptome auftraten; die Tiere hockten mit hervorquellenden Augen

bewegungslos, und man konnte nur daraus auf einen Erregungszustand des Nervensystems schließen, daß sie auf stärkere Reize plötzliche, aber stürmische Reaktionen zeigten (z. B. Sprung) ähnlich wie bei decorticierten Tieren. Erst später bei der 3.—4. Injektion ändert sich das Bild, indem kurz nach Verabfolgung der Injektion eine ständige Unruhe mit gesteigerter Motilität auftritt. Da unter unseren experimentellen Umständen im Laufe der Behandlung eine Wirkung des Morphins (die analgetische) aufhörte und eine andere (die lokomotorische) sich von depressiv in exzitatorisch verwandelte, sind wir der Meinung, daß sich unsere Ratten an das Morphin gewöhnt hatten.

Aus der Tatsache, daß sich unsere mit Morphin behandelten Tiere auch in der „Ruheperiode" viel mehr bewegten als die Kontrollgruppe, geht hervor, daß sich die Erregbarkeit des Nervensystems während der Behandlung änderte. Seevers erwähnt als charakteristisches Symptom der Morphingewöhnung den sogenannten „latent hyperexcitatory state", welcher während der Morphinbehandlung entsteht, aber nur durch abrupte Unterbrechung oder N-allylnormorphin-Anwendung manifest wird. Unserer Meinung dürfte die gesteigerte „Ruhemotilität" unserer gewöhnten Ratten eine manifeste Äußerung dieses sogenannten „latent hyperexcitatory state" darstellen.

Unsere durch Motilitätsversuche gewonnenen Resultate sind nicht auf solche bedingte Reflexe zurückzuführen, welche sich auf die Umstände der Lokomotionsmessung ausbilden konnten, da unsere Tiere nur 3—4mal und in größeren Intervallen in diese Situation gelangten.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß sich bei unseren gewöhnten Tieren auf die motilitätssteigernde Morphinwirkung bedingte Reflexe ausbildeten. Diese Tatsache ist besonders interessant, weil der auf Morphinwirkung sich ausbildende Bewegungszwang eine Erscheinung ist, welche sich auf den Boden des veränderten Zellzustandes während der Gewöhnung entwickelt. Unseres Wissens gibt es in der Literatur bisher keine Mitteilung über bedingte Reflexe, welche sich auf eine, während der Gewöhnung entstandene Wirkung eines Pharmakons ausbilden. Bemerkenswert sind diese bedingten Reflexe aber auch darum, weil wir sie nach Beendigung der Morphinbehandlung — dem Wesen nach in der Abstinenzperiode — beobachteten, in einer Periode also, welche bei manchen Tierspecies durch stürmische, teilweise das Zentralnervensystem betreffende Störungen gekennzeichnet ist. Wir müssen aber bemerken, daß bei Ratten und besonders unter unseren experimentellen Umständen — da wir die Gewöhnung nicht mit steigernden Dosen hervorriefen — keine abstinentielle Syndrome zu beobachten sind.

Unsere Beobachtung der bedingten Reflexe geschah zu einem Zeitpunkt, als die analgetische Wirkung des Morphins nach Beendigung der Behandlung wieder einsetzte und die „Ruhemotilität" der Tiere wieder zur Norm zurückgekehrt war. Zur selben Zeit steigerte aber Morphin die Motilität der Tiere. In dieser Periode kann man also eine während der Gewöhnung verschwundene (analgetische) und eine während der Gewöhnung entstandene (motilitätssteigernde) Wirkung des Morphins gemeinsam beobachten.

Dolin z. B. fand in seinem mit Bulbokapnin ausgeführten Versuchen, daß die auf die Wirkung dieses Pharmakons ausgebildeten bedingten Reflexe so stabil waren, daß, wenn er dem Tier statt Bulbokapnin Dinitrophenol gab, das Ergebnis eine Bulbokapninwirkung war und umgekehrt, wenn die bedingten Reflexe auf Dinitrophenol ausgebildet waren, eine Bulbokapninbehandlung Dinitrophenolwirkung hervorrief. Bei beiden Versuchen zeigte sich, daß die ausgebildeten bedingten Reflexe die pharmakologische Wirkung des Pharmakons wesentlich beeinflußten, veränderten.

Unsere die Darmwirkung des Morphins betreffenden Ergebnisse zeigt die Abb. 1. Jede Kolonne entspricht 10 Versuchs-Tagen. Die Summe der Faeceskugeln der Kontrollgruppe betrachten wir immer als 100%. Die schwarze Kolonne stellt die Summe der durch die gewöhnte Gruppe entleerten Faeceskugeln in Prozent zur Kontrollgruppe dar. Während der 50 Tage der Behandlung war die Stuhlentleerung der behandelten Tiere 17—39% der Kontrollgruppe und in dieser Beziehung keine Gewöhnung an die Morphinwirkung zu beobachten. Nach Beendigung der Behandlung, als beide Gruppen nur phys. NaCl-Lösung bekamen, steigerte sich die Stuhlentleerung der vorher behandelten Gruppe in den ersten 10 Tagen auf 66%, in den zweiten und dritten 10 Tagen auf 84—86%, und erreichte erst später die Menge der Kontrollgruppe. Man kann also feststellen, daß 25—35 Tage nach Beendigung der Morphinbehandlung die Versuchstiere auf NaCl-Injektion weniger Faeces entleerten als die Kontrolltiere, obgleich die Abnahme durchaus nicht so groß war wie auf die Wirkung des Morphins. Die Ergebnisse zeigen auch, daß sich während chronischer Morphinbehandlung keine Gewöhnung an die Darmwirkung entwickelt, es scheint sich sogar ein bedingter Reflex auszubilden.

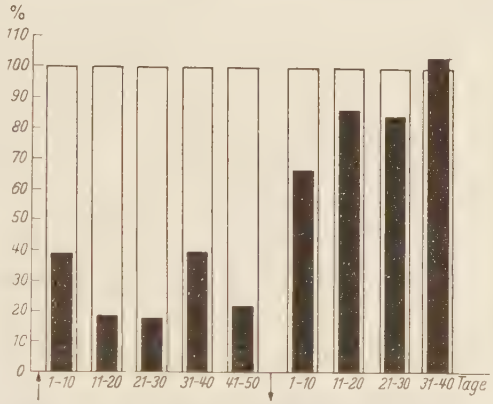


Abb. 1. Darmwirkung des Morphins während dauernder Behandlung. ↑ Anfang der Morphinbehandlung; ↓ Beendigung der Morphinbehandlung. Die schwarze Kolonne stellt die Summe der durch die gewöhnte Gruppe entleerten Faeceskugeln in Prozent zur Kontrollgruppe dar

Nach unseren Ergebnissen bestanden die auf die Darmwirkung entstandenen bedingten Reflexe nach Beendigung der Behandlung etwa 10—15 Tage länger als die Motilitätssteigerung betreffenden Reflexe. Diese Tatsache weist jedenfalls darauf hin, daß die verschiedene Empfindlichkeit der verschiedenen Systeme des Zentralnervensystems gegenüber Morphin sich auch darin äußert, daß die auf einzelne

Morphinwirkungen entstandenen bedingten Reflexe nach Beendigung der Behandlung auch zu verschiedenen Zeitpunkten nachlassen.

Schaumann u. Mitarb. erwiesen kürzlich, daß eine Parallele zwischen den Größen der schmerzstillenden und der Darmwirkungen der morphinähnlichen Analgetik besteht, und sie meinen, daß die Ursache dieser Parallele in den gleichen neuralen Angriffspunkten beider Wirkungen zu suchen ist. Unsere Ergebnisse lassen sich nur schwer mit dieser Auffassung in Einklang bringen, da im Gegensatz zur analgetischen Wirkung keine Gewöhnung an die Darmwirkung, vielmehr sogar Ausbildung bedingter Reflexe beobachtet werden konnte.

Zusammenfassung

1. Bei chronischer Morphinbehandlung registrierten wir quantitativ die lokomotorische und Darmwirkung bei Ratten.

2. Wir haben festgestellt, daß die morphingewöhnten Tiere sich mehr bewegen als die Kontrollratten

3. Die morphingewöhnten Ratten reagieren auf Morphinverabfolgung mit gesteigerter Motilität; auf diese — während der Gewöhnung entstandene — neue Wirkung bilden sich bedingte Reflexe aus, welche nach Beendigung der Morphinbehandlung noch 5—20 Tage lang bestehen.

4. Zur Darmwirkung des Morphins konnte keine Gewöhnung festgestellt werden; dagegen wurde Ausbildung eines bedingten Reflexes auf diese Wirkung beobachtet, welcher 25—35 Tage nach Beendigung der Morphinbehandlung verschwindet.

Literatur

Delov, V. E.: zit.: Bykow, K. M.: Großhirnrinde und innere Organe. Volk und Gesundheit. Berlin 1952. — Dolin, A. O.: Problemy Sowietskoj Physiol., Biochim. i Pharmacol. Moskau 1949; Pawlow-Z. f. höh. Nerventät. **1**, 485 (1951). — Komlós, E., J. Knoll, L. Tardos u. V. Szász: Acta physiol. Hung. (Budapest) **4**, 373 (1953). — Krylow, W. A.: Physiol. Z. d. UdSSR **21**, 825 (1936). — Mavrojannis: zit.: Starkenstein, E.: Handbuch der exp. Pharm. II. Bd. 2 Hälfte 871 (1924). — Sborowskaja, I. I.: Physiol. Z. d. UdSSR **27**, 3 (1939). — Sborowskaja, I. I., u. A. O. Dolin: ibidem **27**, 13 (1939). — Schaumann, O., M. Giovannini u. K. Jochum: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 460 (1952). — Seevers, M. H.: Federat. Proc. **13**, 672 (1954).

Dr. Endre Komlós, Pathophysiologische Abtlg. des „Korányi"-Landesinstituts für Tuberkulose, Budapest/Ungarn

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 469—475 (1956)

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. H. Sarre)

Monophasische Immunpathogenese der experimentellen Nephritis-Nephrose bei Jungtieren

Von
A. Moench und K. Rother

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Juli 1956)

Die immunbiologischen Reaktionsabläufe bei der experimentellen Nephritis-Nephrose nach Masugi sind noch immer umstritten. Nach Kay kommt es bei Injektion von Entenserum mit Antikörpern gegen Kaninchenniere (sog. „Nephrotoxin") in der Niere des betreffenden Empfängertieres zu einem sogenannten „harmless complex" zwischen Kaninchenniere (Antigen) und zugeführtem Antikörper (siehe Abb. 1). Der mitinjizierte Entenserumanteil wirkt seinerseits als unspezifisches heterologes Antigen. In einem Intervall von 5—10 Tagen werden, wie Kay nachwies, im Organismus des betreffenden Tieres Antikörper gegen das zugeführte Entenserum gebildet. Diese gehen mit dem „harmless complex" in der Niere des Tieres eine zweite Antigen-Antikörper-Reaktion ein, die letzten Endes erst zum Entstehen der Nephritis führt. Neben dem Hauptargument der Latenzzeit zwischen Injektion des heterologen Antinieren-Serums (ANS) und Ausbruch der Erkrankung konnte Kay seine Hypothese auf folgendes Experiment stützen: er verhinderte durch Röntgenganzbestrahlung der Kaninchen die Bildung von Antikörpern gegen das zugeführte Enteneiweiß (s. Abb. 1), worauf die Nephritis ausblieb. Gab er aber diesen röntgenbestrahlten Tieren nachträglich ein Anti-Enteneiweiß-Serum von anderen Kaninchen, so flammte die Nephritis auf.

Diese 2-Phasen-Hypothese ist in der Folgezeit von vielen Untersuchern gestützt worden, wobei als Hauptargument übereinstimmend die 4- bis 10-tägige Latenz angeführt wurde sowie das Zusammentreffen des Ausbruches der Nephritis mit dem Auftreten eines vom Empfängertier aktiv gebildeten, gegen das zugeführte Fremdeiweiß gerichteten Antikörpers (z. B. Sarre 1952, Rother 1953). Eine besonders detaillierte Studie über die experimentelle Nephritis nach Rinderalbumin-Injektion kommt zum gleichen Ergebnis (Germuth jun. 1953).

Den zustimmenden stehen jedoch auch einschränkende Untersuchungen gegenüber. So tritt z. B. bei Ratten die Nephritis innerhalb 10 Std nach Injektion des ANS auf (Heymann u. Lund 1948; Pfeiffer, Schöffling, Bruch u. Spielmann 1953), wodurch die Gültigkeit des Kay-Mechanismus von vornherein auf Kaninchen als Versuchstiere beschränkt wird. In diesem Zusammenhang liegt es vielleicht nahe, die bei Kaninchen fehlende lineare Koppelung zwischen Antikörper-Titer gegen das zugeführte Fremdeiweiß (gemessen in mg N, Methode nach Heidelberger) und Schweregrad der Erkrankung (Rother 1953) als Argument gegen die Hypothese Kays anzuführen, was aber aus allgemeinen Gründen ebensowenig als Einwand gelten kann wie auch die gelegentlich zu beobachtende vorübergehende Proteinurie am ersten und zweiten Tag (Moench 1952), die als Ausscheidungsproteinurie deutbar ist. Eine wesentliche Erschütterung bringt vielmehr die Arbeit Rathes (1955), die das zugrunde liegende Experiment Kays nicht zu reduzieren vermochte. Zwar ließ sich die Masugi-Nephritis durch Röntgenbestrahlung verhindern, der entscheidende zweite Teil des Experimentes aber, nämlich die nachträgliche Auslösung durch Injektion eines Anti-Enteneiweiß-Serums mißlang, so daß man wohl annehmen muß, die Röntgenbestrahlung habe die entzündliche Reaktionsfähigkeit der Tiere an sich ausgeschaltet. Die widerspruchsvollen Ergebnisse und die Unsicherheit in der Deutung veranlaßten uns, die Gültigkeit der Kayschen Hypothese an sehr jungen Kaninchen zu überprüfen, bei denen wir in früheren Versuchen die mangelhafte aktive Immunisierbarkeit kennengelernt hatten.

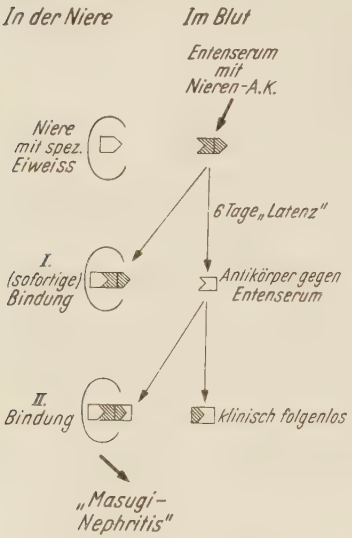


Abb. 1. Schematische Darstellung der Arbeitshypothese von Kay. Einzelheiten siehe Text

Methode

Es kamen 4—6 Wochen alte Kaninchen-Jungtiere beiderlei Geschlechtes zur Untersuchung. Das Anti-Nieren-Serum stand uns in Trockenampullen zur Verfügung (Methode bei Moench, Rother, Sartorius u. Kroneberg, 1955). Das Gewicht der Tiere betrug im Durchschnitt 600—700 g. Sie erhielten eine einmalige Injektion von 0,5 cm³/100 g Antinierenserum (ANS) i.v. (also insgesamt 3—3,5 cm³ je Tier). Im Versuch waren insgesamt 16 Jungtiere von drei verschiedenen Würfen. Hiervon hatten vier Tiere zur Kontrolle lediglich Entenserum erhalten. Die Tiere wurden in Einzelstoffwechselkäfigen gehalten. Untersucht wurden zunächst die

Ausgangswerte. Täglich wurde das Verhalten des Körpergewichts, sowie das Auftreten pathologischer Harnbefunde beobachtet (Sediment, Sulfosalicylprobe, evtl. Esbach).

Am 5., 10., 15. sowie Todestag wurden folgende Bestimmungen im Blutserum durchgeführt:

1. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes im Serum (Jacobson-Linderström-Lang).
2. Papierelektrophoretische Trennung des Serumeiweißes nach der Methode von Grassmann und Hannig).
3. Gesamtcholesterinbestimmung im Serum (Schmidt-Thomé).
4. Na, K, Ca (flammenphotometrisch nach Riehm).
5. nur am Todestag: Rest-N (Kjeldahl).

Vom 3. bis zum 15. Tage wurden außerdem alle zwei Tage 1,5 cm^3 Blut entnommen für

6. Die Antikörperbestimmung gegen das zugeführte Enteneiweiß (quantitative Methode nach Heidelberger). Fehlergrenze bei der von uns benutzten Mikromodifikation $\pm$ 0,005 mg N.

Histologisch wurde am 10. Tage die in Äther-Normalnarkose herausgenommene li. Niere und am Tötungstag die re. Niere untersucht. Methodik: Fixation: 10%iges neutrales Formalin. Gefrierschnitte: ungefärbt zum Nachweis doppelbrechender Lipoide sowie nach Sudan III-Hömatoxylin.

Paraffinschnitte: Hämatoxylin-Eosin, Goldner, Azan.

Ergebnisse

Alle 17 Jungtiere, die Antinierenserum bekommen hatten, erkrankten zum Teil schwer, wobei die klinischen Symptome zwischen 6. und 8. Tag post inj. einsetzten. Hinsichtlich der Ergebnisse der oben angegebenen Untersuchungsmethoden zeigten 7 Tiere klinisch und histologisch am 10. Versuchstag bezüglich aller Kriterien 1—5 das Bild der doppelbrechenden Lipoidnephrose, 8[1] Tiere das Bild der proliferativen Nephritis. Diese Beobachtungen verteilten sich auf die drei im Versuch gewesenen Würfe folgendermaßen:

1. Wurf: 9 Tiere, hiervon 2 als Kontrolle nur mit Entenserum behandelt. Nephritis 5 ×, Lipoidnephrose 2 ×.

2. Wurf: 6 Tiere. Hiervon 1 als Kontrolle nur mit Entenserum behandelt, die übrigen 5 Tiere erkrankten an Nephritis.

3. Wurf: 6 Tiere, eins als Kontrolle. 5 Tiere erkrankten an Lipoidnephrose.

Folgende histologische Unterschiede bestehen zwischen primär lipoidnephrotischer und nephritischer Verlaufsform: Die Lipoidnephrose läßt am 10. Versuchstag ein Zurücktreten der proliferativen Veränderungen im Glomerulabereich erkennen. Dagegen tritt die stärkere Exsudation von Eiweiß in den Kapselraum deutlich in Erscheinung. Die Tubuli zeigen bei der Nephritis noch einen weitgehend intakten Epithelbesatz, bei der Lipoidnephrose dagegen in wechselndem Ausmaß zum Teil

[1] 2 der mit ANS injizierten Jungtiere zeigten histologisch am 10. Tage nur geringe Veränderungen, mehr im Sinne einer „Herdnephritis".

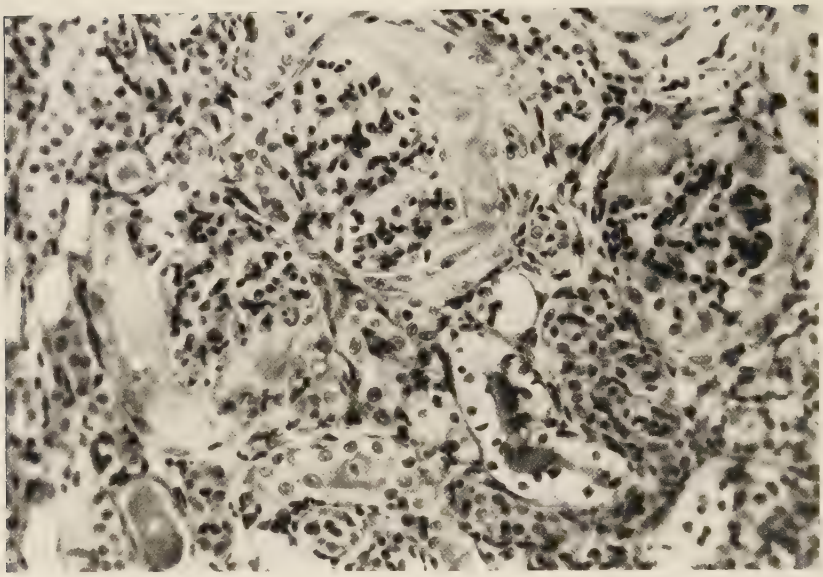


Abb. 2a. Kaninchenjungtier, 10. Tag nach Antinierenserumgabe: Lipoidnephrose (fix. 10% Formalin, Paraffinschnitt, HE. Apochromat 25,0, Optovar 1,6, Ocular 8, Kleinbild, Vergrößerung 320×)

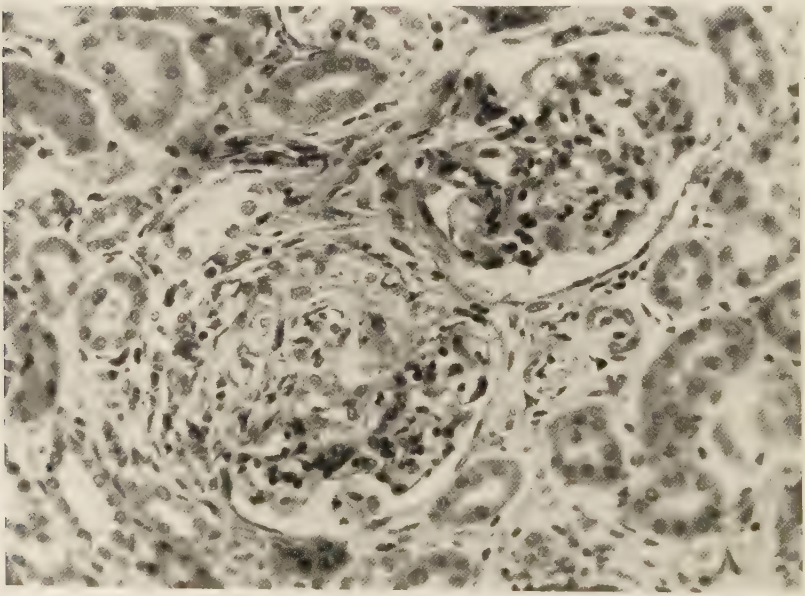


Abb. 2b. Kaninchenjungtier, 10. Tag nach Antinierenserumgabe: proliferative Nephritis

optisch leere Vacuolen, einfach- und doppelbrechende Lipoide in den Tubulusepithelien.

Während auf Abb. 2a und 2b das histologische Bild der erkrankten Nieren zur Darstellung kommt, zeigt die Tabelle den während der Kontrolle in zweitägigem Abstand festgestellten Höchstwert des Antikörpertiters gegen normales Entenserumeiweiß, gemessen in mg N. Dieser Höchstwert lag gewöhnlich zwischen 9.—13. Tag nach Antinierenserumgabe. Die entsprechenden histologischen Nierenbefunde sind in steigendem Schweregrad mit + bis ++++ verzeichnet. Zum Vergleich ist

Tabelle 1. *Vergleichende Untersuchung der Antikörper-Titer gegen Ente bei* Masugi-*Nephritis-Nephrose des Kaninchens gegenüber den histologischen Veränderungen*

Tier-Nr.	höchster Titer	Tag des höchst. Titers nach Inj.	Schweregrad des histologischen Befundes
I. Kontrolle Jungtiere + normales Entenserum			
262	0,000 mg N/0,5 cm³	—	∅
260	0,000 mg N/0,5 cm³	—	∅
111	++	14. Tag	∅
261	0,103 mg N/0,5 cm³	15. Tag	∅
II. Jungtiere + ANS: Nephritis			
74	0,000 mg N/0,5 cm³	—	+ -
76	0,036 mg N/0,5 cm³	10. Tag	++
79	0,000 mg N/0,5 cm³	—	++++
103	+ Tbg.	14. Tag	+ -
104	+ Tbg.	14. Zag	+
105	∅	10. Tag	+
112	+ Tbg.	14. Tag	+
III. Jungtiere + ANS: Lipoid-Nephrose			
146	0,011 mg N/0,5 cm³	9. Tag	+++
147	0,009 mg N/0,5 cm³	9. Tag	++++
148	0,012 mg N/0,5 cm³	7. Tag	++
149	0,022 mg N/0,5 cm³	12. Tag	+++
150	0,020 mg N/0,5 cm³	14. Tag (Todestag)	+++
IV. Kontrolle ausgewachsene Tiere + ANS: in allen Fällen Nephritis:			
872	0,069 mg N/0,5 cm³	8. Tag	+++
864	0,092 mg N/0,5 cm³	7. Tag	++
M 5	0,072 mg N/0,5 cm³	11. Tag	+++
K 875	0,035 mg N/0,5 cm³	5. Tag	++

Serologische Methode: Quantitative Erfassung und Bestimmung der im Blute kreisenden Antikörper nach Heidelberger. Die angegebenen Werte beziehen sich auf mg AK-N pro 0,5 cm³ Serum. ∅ = kein Titer ermittelt. + = nur präzipitiert, keine Stickstoffbestimmung durchgeführt. Nur bei 16 der insgesamt 21 im Versuche gewesenen Jungtiere war aus technischen Gründen der Antikörpertiter bestimmt worden.

das Verhalten des Titers bei einer Gruppe von ausgewachsenen Tieren angegeben (aus Rother 1953).

Die Tabelle stellt dem AK-Titer gegen das zugeführte Enten-Eiweiß (zweite Phase Kays, siehe Einleitung) den Schweregrad des pathologisch-anatomischen Nierenbefundes gegenüber. Man erkennt die in der Mehrzahl der Fälle praktisch ausgebliebene Sensibilisierung gegen das zugeführte nierenantikörperhaltige Enteneiweiß, obwohl schwere und schwerste Nierenläsionen beobachtet wurden. In 2 Fällen (149, 150) fanden sich niedere Titer, die jedoch im Vergleich mit der Kontrollgruppe ausgewachsener Tiere gering sind. Als wesentliches Ergebnis soll besonders auf die schweren Nierenläsionen der Tiere 74 und 79 hingewiesen werden, bei denen sich Antikörper im strömenden Blut mittels Immunpräcipitation überhaupt nicht nachweisen ließen. Wesentlich ist ferner die Feststellung, daß beide Jungtiergruppen, ob nephritische oder primär-lipoidnephrotische Verlaufsform, im Gegensatz zu den ausgewachsenen Tieren wesentliche Antikörper-Titer gegen das zugeführte Enteneiweiß *gleichermaßen* vermissen ließen.

Nach der mißglückten Reproduktion des grundlegenden Kayschen Experimentes durch Rathe (siehe oben) scheinen unsere Ergebnisse auch die Beweiskraft der von Kay und Nachuntersuchern (u. a. wir selbst) herangezogenen Antikörper-Titer der zweiten Phase zu erschüttern. Ebenso entspricht auch die typische Latenz-Zeit zwischen Injektion des Anti-Nieren-Serums und klinischer Manifestation der Erkrankung nicht unbedingt der Zeitspanne bis zum Auftreten der Antikörper gegen Entenserum (siehe Tier 74 und 79). Masugis ursprüngliche Ansicht, daß die eigentliche Nieren-Antinieren-Reaktion (die der ersten Phase Kays entspricht) nicht nur lokalisierend, sondern unmittelbar selbst pathogen wirke (siehe Schema Abb. 1), gewinnt damit wieder an Gewicht.

Zusammenfassung

1. Durch Injektion eines heterologen Antinieren-Serums gelingt es, beim Kaninchen-Jungtier einmal eine reine Nephritis, das andere Mal eine reine primäre Lipoidnephrose zu erzeugen. Dieser alternative Verlauf ist vom Ausbildungsgrad der aktiven Antikörperbildung gegen das zugeführte Fremdeiweiß unabhängig.

2. Bei klinisch und pathologisch-anatomisch schwerer Erkrankung unserer Jungtiere (Kaninchen) war die in 2tägigen Intervallen qualitativ oder quantitativ ermittelte aktive Antikörperbildung gegen das Antinierenserum (zweite Phase Kays) minimal oder blieb ganz aus, während bei ausgewachsenen Tieren hohe Titer nachweisbar waren. Damit erhebt sich die Frage, ob der Auffassung Kays entsprechend der Fremdeiweißcharakter des Entenserums im Masugi-Versuch tatsächlich

ein integrierender Faktor beim Zustandekommen der Nierenerkrankung des Kaninchens ist.

3. Die ursprüngliche Auffassung Masugis, daß die eigentliche Nieren-Antinieren-Reaktion unmittelbar pathogen wirke, gewinnt wieder an Boden.

Literatur

Germuth, F. jun.: J. of Exper. Med. **97**, 276 (1953). — Grassmann, W., K. Hannig u. M. Knedel: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 333. — Heidelberger, M., u. F. E. Kendall: J. of Exper. Med. **50**, 809 (1929). — Heymann, W., and H. Lund: Science (Lancaster, Pa.) **108**, 448 (1948). — Jacobson, C., u. K. Linderström-Lang: Acta physiol. scand. (Stockh.) **1**, 149 (1942). — Kay, C. F.: J. of Exper. Med. **72**, 559 (1940). — Amer. J. Med. Sci. **204**, 483 (1942). — Moench, A., H. Sartorius, u. K. Pütter: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **61**, 293 (1955). — Moench, A., K. Rother, H. Sartorius u. C. Kroneberg: Z. exper. Med. **126**, 471 (1955). — Pfeifer, E. F., K. Schöffling, H. Bruch u. W. Spielmann: Z. exper. Med. **122**, 446 (1950). — Rathe, J.: Helvet. med. acta **22**, 133 (1955). — Riehm, H.: Z. anal. Chem. **128**, 231 (1954). — Rother, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 448 (1953). — Sarre, H., u. K. Rother: Klin. Wschr. **1954**, 410. — Sarre, H.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 1158. — Schmidt-Thomé, J.: in Schettler, G.: Ärztl. Forsch. **1**, 232 (1947).

Doz. Dr. A. Moench u. Dr. K. Rother, Med. Univ.-Poliklinik,
Freiburg i. Br., H.-Herder-Str. 6

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 476—481 (1956)

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Direktor: Prof. Dr. F. Jung)

Der Stoffwechsel im Erstickungsversuch unter Chlorpromazin und Regitin *

Von

Horst Ankermann

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juli 1956)

In Erstickungsversuchen an weißen Mäusen konnten wir unter Propaphenin** (Chlorpromazin) eine Steigerung der Empfindlichkeit der Tiere gegen Sauerstoffmangel nachweisen[2]. Bei diesen Versuchen beobachteten wir, daß der RQ der Kontrolltiere mit Eintritt des Sauerstoffmangels stets auf einen Wert von 1,0 übergeht. Diese Umstellung auf einen reinen Kohlenhydratstoffwechsel ist auf eine Erregung des sympathischen Nervensystems mit Ausschüttung von Adrenalin und Mobilisierung der Glykogenreserven zurückzuführen[5]. Sie bleibt unter der Wirkung von Propaphenin und Regitin aus. Da jedoch unter Propaphenin die RQ-Werte stets bedeutend niedriger gefunden wurden als unter Regitin, vertraten wir die Auffassung, daß neben der sympathicolytischen[10, 14] auch die direkt hemmende Wirkung des Propaphenin auf den Kohlenhydratstoffwechsel[1, 11] zur Erklärung der von uns erhaltenen Befunde herangezogen werden müsse. Das konnte durch die folgenden Untersuchungen bestätigt werden.

Methode

Die Erstickungsversuche wurden an weißen, männlichen Mäusen mit einem Gewicht zwischen 16 und 19 g durchgeführt. An das doppelwandige und durch einen Thermostaten temperierte Erstickungsgefäß war ein sehr empfindliches Spirometer angeschlossen, dessen Absinken während des Versuches direkt auf eine langsam laufende Rußtrommel übertragen wurde. Das Erstickungsgefäß war aus Glas und hatte einen Rauminhalt von 150 ml. Der Rauminhalt des Spirometers betrug auf 1 cm Höhe 2,5 ml.

Die Erstickungsversuche fanden unter Anreicherung der von den Tieren entwickelten Kohlensäure bei 18° C statt. Die Kohlensäure selbst erhöht die Empfindlichkeit der Tiere gegen Sauerstoffmangel[2, 13]. Wir nahmen diesen Umstand in Kauf, weil sich in der gewählten Versuchsanordnung die Möglichkeit bietet, in einfacher Weise einen Einblick in Stoffwechselvorgänge zu erhalten, und unsere

* Regitin = 2(N-p-Polyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin.

** Propaphenin ist chemisch identisch mit Megaphen (Largactil).

Schlußfolgerungen sich aus einem Vergleich zwischen Kontrollen und Versuchstieren unter gleichen äußeren Bedingungen ergeben. — Während der Versuche sank das Spirometer um ein Volumen ab, das durch die Volumdifferenz zwischen Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureentwicklung gegeben ist. Dieser Volumdifferenz für den gesamten Versuch entspricht in den Abb. 1 und 2 die Strecke *a*. Nach dem Tode der Tiere wurde die Kohlensäure nach dem von HECHT angegebenen Verfahren[9] mit Kalilauge gebunden. Strecke *b* gibt in den Abb. 1 und 2 das Absinken des Spiro-

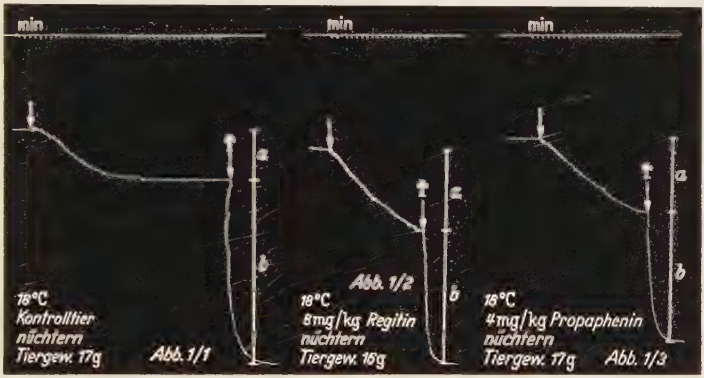


Abb. 1. Erstickungsversuche an nüchternen Mäusen. Die Kurven geben das Absinken des Spirometers während des Versuches (Strecke *a* Volumdifferenz zwischen Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureentwicklung der Tiere) und der Bindung der Kohlensäure nach Eintritt des Todes der Tiere (Strecke *b*) wieder. Weitere Erläuterungen siehe unter Methode

meters während der Bindung der Kohlensäure wieder. Die Strecken $a - b$ entsprechen demnach dem Sauerstoffverbrauch der Tiere, und der RQ für den Gesamtversuch ist nach $\frac{b}{a+b}$ zu errechnen.

Das Propaphenin wurde in allen Versuchen 30 min, das Regitin 15 min vor Einschluß der Tiere in das Erstickungsgefäß in physiologischer Kochsalzlösung s.c. appliziert.

Ergebnisse

Erstickungsversuche nach einer Nahrungskarenz von 16—20 Std

Werden Mäuse 16—20 Std nach Beginn der Nahrungskarenz in das Erstickungsgefäß eingeschlossen, so liegen die RQ-Werte zu Versuchsbeginn weit unter 1,0. Es lassen sich keine genaueren Angaben über die RQ-Werte während des Versuches machen, da bei RQ-Werten unter 1,0 das Absinken des Spirometers, also die Volumverminderung in der Erstickungsanlage, nicht nur durch die Größe des RQ, sondern auch durch die Intensität des Stoffwechsels bestimmt wird. Gegen Ende des Versuches geht der RQ bei allen Kontrolltieren auf einen Wert von 1,0 über. Das ist gut zu erfassen, da bei einem RQ von 1,0 der Volumverlust durch den Verbrauch von Sauerstoff quantitativ durch die von den Tieren in der gleichen Zeit entwickelte Kohlensäure ausgeglichen wird und das Spirometer nicht weiter absinkt (Abb. 1 1). Der RQ für den

Gesamtversuch zeigt bei 11 Tieren einen durchschnittlichen Wert von 0,72 (Abb. 3).

Unter Regitin sind die Tiere nicht in der Lage, diese Umstellung im Stoffwechsel durchzuführen. Der RQ bleibt während des ganzen Versuches bei Werten bedeutend unter 1,0 (Abb. 1/2). Der RQ für den gesamten Versuch liegt nach 8 mg/kg Regitin bei 0,67 (5 Tiere, Abb. 3).

Auch unter Propaphenin findet im Laufe des Versuches keine Umstellung der Tiere auf den Kohlenhydratstoffwechsel statt (Abb. 1/3).

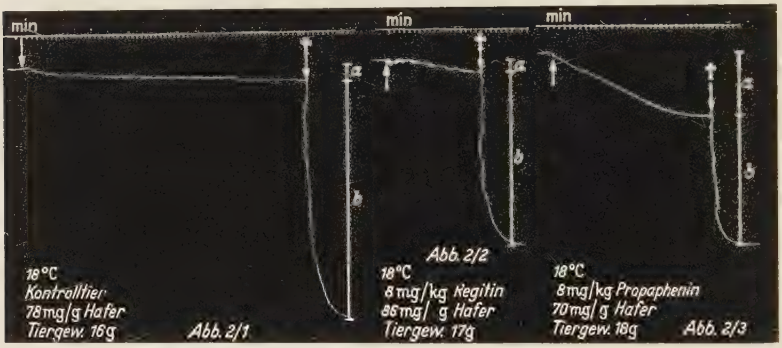


Abb. 2. Erstickungsversuche an gefütterten Mäusen. Erläuterungen siehe Text Abb. 1

Mit 0,62 nach 4 mg/kg (9 Tiere) und 0,63 nach 8 mg/kg Propaphenin (5 Tiere) liegen die RQ-Werte für den Gesamtversuch weit unter den Kontrollwerten (Abb. 3).

Erstickungsversuche nach Nahrungszufuhr

Durch Fütterung der Tiere nach einer 14—16stündigen Nüchternperiode mit abgewogenen Mengen von Hafer 120—30 min vor Einschluß in die Erstickungsanlage werden die RQ-Werte in den Erstickungsversuchen erhöht. Durch Begrenzung der angebotenen Hafermengen kann man den RQ für den Gesamtversuch beliebig zwischen 0,7 und 1,0 einstellen. Nach Haferaufnahme von 50—90 mg pro Gramm Tier liegen schon zu Versuchsbeginn die RQ-Werte nahe bei 1,0 (Abb. 2/1). Bei gleicher Haferaufnahme zeigt der RQ für den Gesamtversuch Werte zwischen 0,9 und 1,0 (Abb. 3).

Mit Regitin behandelte Tiere zeigen nach Haferfütterung ein gleichsinniges Verhalten der RQ-Werte wie die Kontrolltiere. Das geht sowohl aus dem in Abb. 2/2 wiedergegebenen Versuchsverlauf wie auch aus den RQ-Werten für den Gesamtversuch in Abb. 3 hervor.

Unter Propaphenin dagegen liegt der RQ auch nach Fütterung während des Versuchsverlaufs bei Werten weit unter 1,0 (Abb. 2/3). Die

RQ-Werte für den Gesamtversuch liegen nach 4 mg/kg Propaphenin niedriger als bei den Kontrolltieren und steigen nach 8 mg/kg trotz intensiver Fütterung kaum über 0,7 an (Abb. 3).

Diskussion

In Versuchen zu den Problemen der „potenzierten" Narkose erhielten Laborit[11] und Benitte[3] Befunde, die auf Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel durch den sog. „coctail lytique" schließen ließen. Sie beobachteten u. a. eine Erniedrigung der RQ-Werte, ein Ansteigen der Blutzuckerwerte und in chronischen Versuchen einen vermehrten Abbau von Eiweiß. Laborit schreibt die Wirkung des „coctail lytique" auf den Kohlenhydratstoffwechsel vor allem seinem wichtigsten Inhaltsstoff, dem Chlorpromazin zu, das den Sauerstoffverbrauch des isolierten Gewebes herabsetzt[6, 8, 12] und die aerobe und anaerobe Glykolyse hemmt[4]. Wir fanden in Erstickungsversuchen an weißen Mäusen, daß mit Propaphenin behandelte Tiere im Gegensatz zu den Kontrolltieren nicht in der Lage sind, bei Eintritt des Sauerstoffmangels von einem vorwiegend Fett-Eiweiß-Stoffwechsel auf einen reinen Kohlenhydratstoffwechsel überzugehen. Auch unter Regitin bleibt diese Umstellung im Stoffwechsel aus. Da aber die RQ-Werte für den Gesamtversuch unter Propaphenin bedeutend niedriger gefunden wurden als unter Regitin, konnte die Erklärung für das Ausbleiben der Stoffwechselumstellung unter Propaphenin nicht allein in seiner sympathicolytischen Wirkung gesucht werden. Die Durchführung von Erstickungsversuchen an gefütterten Tieren ermöglichte den Nachweis einer direkten Wirkung des Propaphenins auf den Kohlenhydratstoffwechsel.

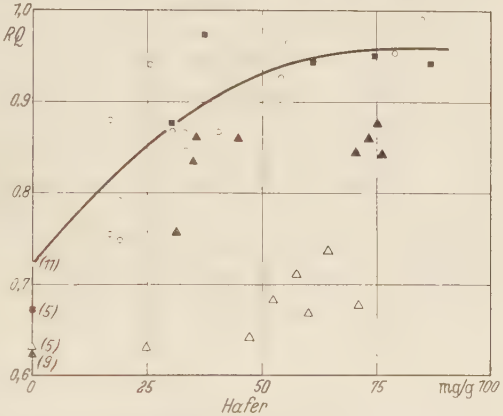


Abb. 3. Veränderungen der RQ-Werte im Erstickungsversuch durch Zuführung steigender Mengen von Hafer. Die Angaben für den RQ beziehen sich auf den Gesamtversuch. Die Nüchternwerte stellen Mittel von mehreren Tieren dar (Tierzahl in Klammern). Weitere Erläuterungen siehe unter Methode

○ Kontrollen
▲ 4 mg/kg } Propaphenin
△ 8 mg/kg }
▪ 8 mg/kg Regitin

Mit steigenden Mengen aufgenommenen Hafers tritt in den Erstickungsversuchen der Kohlenhydratstoffwechsel immer mehr in den Vordergrund. Nach Aufnahme von 50–90 mg/g Hafer liegt der RQ

bereits zu Beginn des Versuches bei Werten nahe 1,0. Für den Gesamtversuch finden wir nach gleicher Futteraufnahme RQ-Werte zwischen 0,9—1,0. Wie oben festgestellt wurde, sind nüchterne Tiere unter Regitin nicht in der Lage, Kohlenhydrate bei Eintritt einer Notsituation zu mobilisieren. Werden aber Kohlenhydrate durch Fütterung zugeführt, so findet ihre Verwertung unter Regitin in gleicher Weise statt wie bei den Kontrolltieren. Trotz intensiver Fütterung bleibt dagegen der RQ nach 4 mg/kg Propaphenin für den Gesamtversuch bei Werten unter 0,9 und steigt nach 8 mg/kg unter den gleichen Bedingungen kaum über einen Wert von 0,7 an. Demnach hemmt also das Propaphenin nicht nur wie das Regitin das sympathico-adrenale System, sondern führt im Unterschied zum Regitin auch zu einer Störung der Verwertung zugeführter Kohlenhydrate. Diese Tatsache muß sich auch in einfachen Stoffwechselversuchen nachweisen lassen. Wenn von verschiedenen Untersuchern unter Propaphenin keine Veränderungen des RQ gefunden wurden[1, 7], so liegt das allein daran, daß sie die Tiere nach einer langen Nüchternperiode in den Versuch nahmen. Unter solchen Bedingungen liegen auch die RQ-Werte der Kontrolltiere bereits im Bereich des Fett-Eiweiß-Stoffwechsels.

Zusammenfassung

1. Die Verwertung zugeführter Kohlenhydrate wird in Erstickungsversuchen an weißen Mäusen unter Regitin und Propaphenin (Chlorpromazin) untersucht.

2. Durch Fütterung der Tiere mit begrenzten Mengen von Hafer nach einer 14—16stündigen Nüchternperiode 120—30 min vor Beginn des Erstickungsversuches sind die RQ-Werte für den Gesamtversuch beliebig zwischen 0,7 und 1,0 einzustellen.

3. Propaphenin hemmt die Verwertung zugeführter Kohlenhydrate, Regitin hingegen nicht.

4. Die in früheren Untersuchungen gemachte Beobachtung wird bestätigt, wonach nüchterne Tiere unter Propaphenin und Regitin im Gegensatz zu unbehandelten Tieren nicht in der Lage sind, bei Eintritt des Sauerstoffmangels auf einen reinen Kohlenhydratstoffwechsel überzugehen.

Literatur

[1] L'Allemand, H., W. Brendel u. W. Usinger: Anaesthesist **4**, 36 (1955). — [2] Ankermann, H.: Pharmazie **11**, 542 (1956). — [3] Benitte, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 20 (1954). — [4] Bernsohn, J., I. Namajuska and L. S. G. Cochrane: Federat. Proc. **14**, 182 (1955). — [5] Cannon, W. B.: Erg. Physiol. **27**, 380

(1928). — [6] Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — [7] Feller, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 269 (1955). — [8] Gänshirt, H., u. A. Brilmayer: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 467 (1954). — [9] Hecht, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **166**, 432 (1932). — [10] Krause, D., u. D. Schmidtke-Ruhnau: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 243 (1955). — [11] Laborit, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 41 (1954). — [12] Peruzzo, L., et R. B. Forni: Presse méd. **61**, 1463 (1953). — [13] Smith, A. U., C. W. Emmens and A. S. Parkes: J. of Endocrin. **5**, 186 (1946). — [14] Vanlerenberghe, J., A. Robelet et G. Milbled: Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 421 (1954).

Dr. H. Ankermann, Institut f. Pharmakologie d. Humboldt-Universität,
Berlin W 8, Clara-Zetkin-Str. 94

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 482—494 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Der Tag-Nacht-Rhythmus der Diurese, Elektrolytausscheidung und Clearance des echten endogenen Kreatinins bei der Ratte

Von
H. Brunner, G. Kuschinsky, O. Münchow und G. Peters*

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Juli 1956)

Tag-Nacht-Unterschiede der renalen Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten (A. Pütter, 1926; R. C. Manchester, 1933; G. E. Simpson, 1924, 1926) und auch der Menge des Glomerulusfiltrats (H. Popper, J. Brod, 1938; J. Brod, 1946) beim Menschen sind seit längerer Zeit bekannt. Die gesteigerte exkretorische Tätigkeit der Nieren während des Tages wird zwar häufig mit der Verteilung der Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme oder auch der körperlichen Aktivität in Verbindung gebracht, scheint aber in Wirklichkeit von beiden Faktoren unabhängig zu sein und in direkter Beziehung zum Wach- bzw. Schlafzustand zu stehen (G. E. Simpson 1926, 1929; J. H. Sirota et al. 1950). Es erschien daher interessant, zu untersuchen, inwieweit umgekehrte Nacht-Tag-Unterschiede beim Nagetier mit seinem umgekehrten Nacht-Tag-Aktivitätsrhythmus bestehen. Darüber hinaus ist die Kenntnis eventueller Verschiedenheiten der Nierentätigkeit bei Tag und Nacht dann wichtig, wenn Ergebnisse aus Diureseversuchen über 24-Stundenperioden mit Ergebnissen von akuten kurzdauernden Versuchen verglichen werden sollen, und wenn Versuche gleichen Typs entweder während der Ruhe- oder Aktivitätsperiode von Ratten ausgeführt werden müssen. Letztlich war die Frage zu beantworten, ob bei Tag und bei Nacht Unterschiede der maximalen Ausscheidungsgeschwindigkeit nach Belastung mit größeren Wasser- oder Elektrolytmengen bestehen.

Methodik

Versuche bei Spontan-Nahrungs- und Wasseraufnahme. Die Versuche wurden bei konstanter Temperatur von 28 ± 2° C, aber nicht bei konstanter Beleuchtung, in besonderen Stoffwechselkäfigen durchgeführt, in denen die Tiere — bei freiem Luftzutritt von allen Seiten — reichliche Bewegungsfreiheit hatten. Die Ratten, Männchen und Weibchen im Gewicht zwischen 150 und 250 g, wurden vor den Versuchen

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

durch 5—8tägigen Aufenthalt in den Stoffwechselkäfigen eingewöhnt. Als Trinkflüssigkeit erhielten sie ad lib. destilliertes Wasser; die Nahrung bestand in gleichfalls ad lib. angebotenem, zu Mehl gemahlenem Latz-Rattenfutter (Fa. Latz, Euskirchen im Rhld.), das nach unseren Bestimmungen pro 100 g 22,1 mÄq (508 mg) Natrium, 20,6 mÄq (806 mg) Kalium und 17,0 mÄq (604 mg) Chlorid enthielt. Von den jeweils gleichzeitig eingewöhnten 12—14 Tieren wurde dann ungefähr je die Hälfte der Tag- bzw. Nachtgruppe zugeteilt. Die Harnsammlung erfolgte für die Taggruppe von 8 Uhr bis 20 Uhr, für die Nachtgruppe von 20 Uhr bis 8 Uhr; zu Beginn und zu Ende der Harnsammelperiode wurde in der früher beschriebenen Weise (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956a) für Entleerung der Blase gesorgt. Gleichzeitig wurde jeweils der Wasserstand in den Trinkgefäßen festgestellt. Am Ende der Harnsammelperiode wurde von jedem Tier ohne Narkose durch Schwanzabschneiden ungefähr 1,0 ml Blut in ein heparinisiertes Zentrifugenglas abgenommen. Bezüglich der chemischen Bestimmungsmethoden s. u. Die in der Abb. 1 wiedergegebenen Werte stellen Mittelwerte aus Gruppen von jeweils 12—14 Tieren dar, von denen je die Hälfte immer verschiedenen Versuchsgruppen angehörte. Als Maß der Streuung ist immer ± 1 Standardabweichung der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) angegeben. Die Testung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten erfolgte nach der Zweigruppen-Streuungszerlegungs-Methode (G. W. Snedecor 1950).

Versuche an durstenden Ratten. Die Tiere wurden durch zweimaliges mehrstündiges Einsetzen in die Diuresekäfige bei 28° C an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Sie erhielten bis zum Versuchsbeginn Gerstenkörnerfutter und Wasser ad lib.; zusätzlich vom 3. Tag vor Versuchsbeginn ab 0,9% NaCl-Lösung ad lib. Die Harnsammlung wurde bei 28° C in Diuresekäfigen bei völliger Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz durchgeführt. Da hier am Ende der Tag- bzw. Nachtperiode kein Blut entnommen wurde, konnte eine statistisch günstigere Versuchsanordnung gewählt werden. Diese Anordnung ermöglicht eine Ausschließung der durch die Nahrungs- bzw. Wasseraufnahme in dem der Harnsammelperiode vorangehenden Zeitraum bedingten Schwankungen der Nierentätigkeit. Zu diesem Zweck wurde einmal eine aus der Gesamtzahl der zum Versuch vorbereiteten Ratten nach Zufallskriterien ausgewählte Gruppe von 34 Tieren (17 ♂ + 17 ♀) um 8 Uhr vormittags in die Diuresekäfige eingesetzt und anschließend der Harn in zwei getrennten Portionen von 8 bis 20 Uhr und von 20 bis 8 Uhr gesammelt; eine zweite gleichgroße, gleichfalls nach Zufallskriterien ausgewählte Gruppe wurde am folgenden Abend um 20 Uhr in die Diuresekäfige verbracht, und daran aufeinanderfolgende Harnsammelperioden von 20 bis 8 Uhr und von 8 bis 20 Uhr angeschlossen. Bezüglich der Methoden der chemischen Bestimmung der Harnbestandteile s. u. Aus den für die Wasser-, Na^+-, K^+-, Cl^+-, H^+- und NH_4^+-Ausscheidung für die Tag- oder die Nachtperiode erhaltenen Werten wurden jeweils Mittelwerte und Streuung berechnet. In Abb. 2 sind als Säulen die Mittelwerte wiedergegeben. Die Gesamtstreuung der Werte wurde jeweils in die durch die Unterschiede der ersten und zweiten 12 Std von Nahrungs- und Wasserkarenz, der beiden Gruppen an sich und die durch die Unterschiede von Tag und Nacht bedingten Anteile nach der Methode der Varianzanalyse (G. W. Snedecor 1950) zerlegt (Beispiel s. Legende zu Abb. 2).

Bestimmung der Maximaldiurese und der Elektrolytausscheidung innerhalb von 2 Std nach oraler „Wässerung" mit Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung. Die maximale Wasserausscheidungsgeschwindigkeit nach der Gabe von 10,0 + 8,0 ml Wasser bzw. von 7,0 + 5,0 ml 0,9% NaCl-Lösung wurde nach dem früher beschriebenen Verfahren (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956b) bei je einer Gruppe von 20 Ratten (10 ♂ + 10 ♀) vormittags zwischen 8 und 13 Uhr bestimmt. Bei den gleichen Tieren wurden die gleichen Bestimmungen 4 Tage später zwischen 20 Uhr und 1 Uhr nachts wiederholt. Hierauf wurde bei einer zweiten, gleichgroßen Gruppe

von Tieren in der gleichen Weise die Maximaldiurese nach Wässerung mit Wasser oder mit isotonischer Kochsalzlösung in einem ersten Versuch nachts zwischen 20 Uhr und 1 Uhr und 4 Tage später bei Tag zwischen 8 Uhr und 13 Uhr bestimmt. Aus den Ergebnissen wurden getrennt für Männchen und Weibchen Mittelwerte für die Maximaldiurese nach den beiden verschiedenen Wässerungsarten bei Tag oder bei Nacht errechnet. Die sich ergebenden Gesamtstreuungen wurden in 1. die durch Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen von Tieren, 2. die durch Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen, 3. die durch Unterschiede zwischen den Ergebnissen der jeweils ersten und zweiten Bestimmung der Maximaldiurese und schließlich 4. die durch unterschiedliches Verhalten bei Tag und bei Nacht bedingten Komponenten zerlegt.

Die in den Wässerungsversuchen in einem 2-Stunden-Zeitraum, beginnend von der 20. Minute nach der Wässerung, ausgeschiedenen Elektrolyte wurden bestimmt; die statistische Behandlung der erhaltenen Ausscheidungswerte war die gleiche wie bei den Maximaldiuresewerten.

Die Versuche wurden in der Zeit von November 1955 bis Mai 1956 ausgeführt.

Chemische Bestimmungsmethoden. Im Harn wurden Natrium, Kalium, Chlorid, Titrationsazidität und Ammonium-Ionen nach den früher geschilderten Verfahren (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956a) bestimmt. — Gleich nach der Blutentnahme von den Erythrocyten abgetrenntes Plasma wurde zur Bestimmung der Elektrolyte zunächst mit dem vierfachen Volumen 0,75 n HNO_3 extrahiert. Zur flammenphotometrischen Bestimmung von Natrium und Kalium wurde dieser Extrakt mit destilliertem Wasser weiter verdünnt. Zur Bestimmung von Chloriden wurde der Extrakt zunächst mit 0,75 n NaOH neutralisiert und dann entsprechend dem Verfahren von G. Kuschinsky u. H. Langecker (1947) mit Zinkhydroxyd enteiweißt und merkurimetrisch titriert.

Bestimmung von *Kreatinin.* Das Gesamt-Kreatinin-Chromogen wurde in Plasma und Harn nach dem Verfahren von S. R. Benedict u. J. A. Behre (1936) in der Modifikation von G. R. Kingsley, R. R. Schaffert u. M. Reiner (1953) colorimetrisch bestimmt. — Der Anteil von echtem Kreatinin am Gesamt-Kreatinin-Chromogen wurde nach dem durch F. Løken 1954 wesentlich verbesserten Verfahren von H. Borsook (1935) und R. S. Hare (1949, 1950) durch Adsorption des echten Kreatinins an besonders gereinigte Fuller-Erde (Lloyd's Reagens) im sauren Milieu und anschließende Elution mit alkalischer Pikratlösung bestimmt. Da nur kleine Mengen von Plasma zur Verfügung standen, wurde die Bestimmungsmethode in der folgenden Weise modifiziert: 0,4 ml Plasma + 1,6 ml H_2O (bzw. nötigenfalls auch 0,2 ml Plasma + 1,8 ml H_2O) werden durch Zusatz von 2,0 ml genau 1 n Trichloressigsäure enteiweißt. Vom Zentrifugat werden 2,0 ml in ein Zentrifugenglas gebracht, in das vorher ungefähr 40 mg Lloyd's Reagens eingebracht wurden. (Als Lloyd's Reagens haben wir in der Mehrzahl der Versuche Fuller Earth for Adsorption Purposes der Fa. British Drug Houses, in einem Teil der Versuche auch ein ausländisches Präparat unbekannter Provenienz* mit gleichen Ergebnissen verwandt.) Zur vollständigen Adsorption werden Lloyd's Reagens und das trichloressigsaure Zentrifugat durch mindestens 6maliges Umrühren mit einem sauberen Glasstäbchen während einer Adsorptionsdauer von 20 min bei Zimmertemperatur gut durchmischt. Anschließend wird 5 min lang bei 2500—3000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Zentrifugat wird sehr vorsichtig und möglichst vollständig dekantiert oder abgesaugt: es muß darauf geachtet werden, daß keine noch so kleinen Teilchen von Lloyd's Reagens dabei verloren gehen. Zur Elution und gleichzeitigen Jaffé-Reaktion werden zum abzentrifugierten, möglichst trockenen Lloyd's

* Wir danken der Firma E. Merck, Darmstadt, für die Überlassung des erwähnten ausländischen Präparates von Lloyd's Reagens.

Reagens 2,0 ml der *genau* nach der Vorschrift von F. Løken (1954) hergestellten alkalischen Pikratlösung zugefügt und der Niederschlag durch 5maliges Verrühren mit einem Glasstäbchen gut mit der Elutionslösung durchmischt. Das alkalische Pikratreagens wird in folgender Weise hergestellt: Zu der erforderlichen Menge gesättigter Pikrinsäurelösung (pro analysi-Qualität von Merck) wird tropfenweise eine 20%ige NaOH-Lösung zugefügt, bis die Lösung ein p_H von 8–9 (Universalindicatorpapier) erreicht hat. Unter dauerndem Schütteln wird dann aus einer Bürette weiter gesättigte Pikrinsäurelösung zugetropft, bis das p_H möglichst genau 7,0 beträgt. Zu 5 Teilen der so erhaltenen gesättigten neutralisierten Pikrinsäurelösung werden 12 Teile Wasser und 1 Teil 5,5% NaOH-Lösung zugefügt. — Die Fuller-Erde wird wiederum durch 5 min Zentifugieren bei 2500—3000 Umdrehungen abgetrennt und die Farbintensität des Überstehenden gegen eine Leerprobe (statt Plasma Wasser) im Pulfrich-Stufenphotometer mit Filter S 50 (Absorptionsmaximum bei 496 mμ) oder in einem photoelektrischen Spektrophotometer bei 485–490 mμ bestimmt. Zur Herstellung von Eichkurven müssen Kreatininlösungen in gleicher Weise, wie für Blut angegeben, behandelt werden. — Zur Bestimmung von echtem Kreatinin im Harn wird der Harn 30—100mal verdünnt und dann ebenso wie Plasma behandelt; der Trichloressigsäurezusatz darf wegen der p_H-Einstellung des Endgemisches nicht unterlassen werden.

Ergebnisse

1. Wasseraufnahme und Diurese

Die Wasseraufnahme ist bei spontan trinkenden und gefütterten Ratten beider Geschlechter während der Aktivitätsperiode (Nacht) im Mittel etwa 5mal größer als bei Tag. Die sehr großen relativen Streuungen der Wasseraufnahme bei Tag erklären sich daraus, daß in allen Gruppen ungefähr die Hälfte der Tiere am Tag überhaupt nicht trinkt bzw. nur gelegentlich einmal für wenige Sekunden am Trinkröhrchen leckt. Die Tag-Nacht-Unterschiede in der Diurese spontan trinkender und ernährter Ratten (Abb. 1) sind erheblich geringer: bei männlichen Tieren ist die Diurese nachts signifikant um etwa $^1/_5$ gesteigert; bei weiblichen Tieren ist diese Steigerung sehr viel weniger konstant, so daß die Streuung des nachts gleichfalls höheren Mittelwertes sehr viel größer wird und ein signifikanter Unterschied bei der gleichen Tierzahl nicht mehr nachgewiesen werden kann. Der Vergleich der Werte für Wasseraufnahme und -abgabe zeigt, daß die Wasserbilanz nachts stark positiv und tagsüber stark negativ ist. Es besteht somit während der Aktivitätsperiode ein Trinkbedürfnis, das überschießend befriedigt wird: die überschüssig aufgenommene Wassermenge wird dann über den Tag verteilt langsam ausgeschieden: daraus erklärt sich die sehr viel höhere Tag-Diurese der tagsüber freiwillig nicht trinkenden Tiere gegenüber den vollständig durstenden Tieren (vgl. Abb. 1 mit Abb. 2). Das primum movens für das erhöhte Wasserbedürfnis während der Aktivitätsperiode scheint aber die nachts erhöhte renale Wasserausscheidung zu sein: denn bei *durstenden* Ratten beider Geschlechter (Abb. 2) liegt die Diurese nachts höher als tagsüber. Dieser Unterschied ist bei den männlichen Tieren sehr viel stärker ausgeprägt

als bei den weiblichen, läßt sich aber auch bei den letzteren eindeutig nachweisen. Der Unterschied zwischen der Diurese bei Tag und bei Nacht

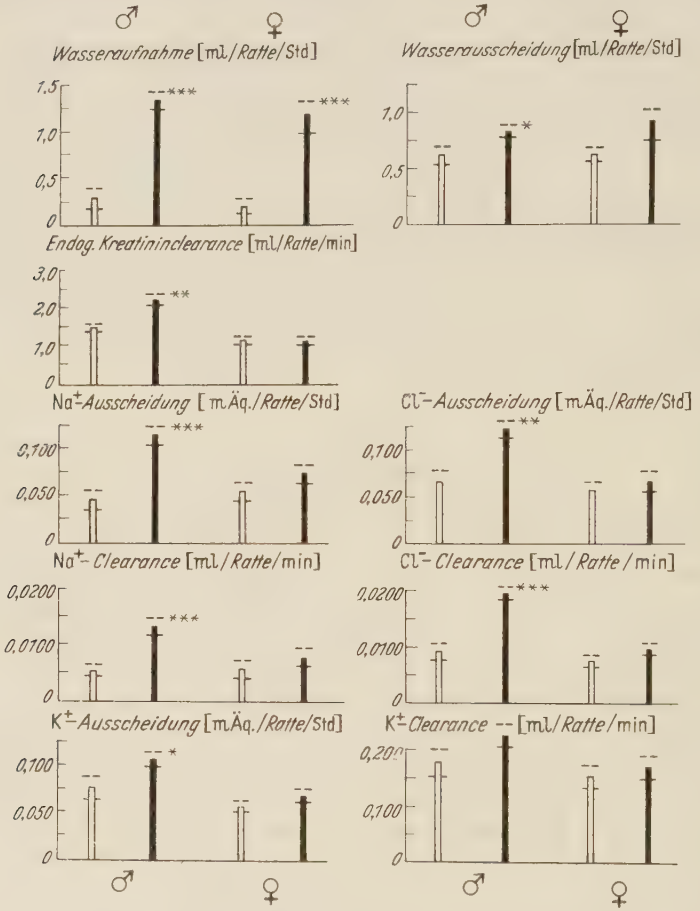


Abb. 1. *Exkretorische Nierenfunktionen von männlichen und weiblichen Ratten bei Tag und bei Nacht bei freier Wasser- und Nahrungsaufnahme.*

Alle Werte errechnet aus 12 Stunden-Harnsammelperioden von 8 bis 20 Uhr bzw. von 20 bis 8 Uhr. Jede Säule gibt den Mittelwert einer Gruppe von 11—14 Tieren wieder; die seitlichen Striche bezeichnen $\pm$ 1 $s_{\bar{x}}$. Die Tagwerte sind durch weiße Säulen, die Nachtwerte durch schwarze Säulen bezeichnet. Die getestete Signifikanz des Unterschiedes zwischen der Tag- und der entsprechenden Nachtgruppe ist in folgender Weise bezeichnet: * = $P<0{,}05$; ** = $P<0{,}01$; *** = $P<0{,}001$. Bestimmungsmethoden und Versuchsanordnung s. Methodik.

tritt bei durstenden Ratten anscheinend deshalb viel stärker in Erscheinung als bei frei trinkenden Tieren, weil er nicht durch die nachhinkende Ausscheidung der nachts zuviel getrunkenen Wassermengen verwischt wird.

Die maximalen Wasserausscheidungsgeschwindigkeiten nach oraler Gabe größerer Mengen von Wasser oder von isotonischer NaCl-Lösung sind im Gegensatz zu den Geschwindigkeiten der unbeeinflußten Diurese bei Tag und Nacht nicht so eindeutig unterschieden (s. Tab. 1).

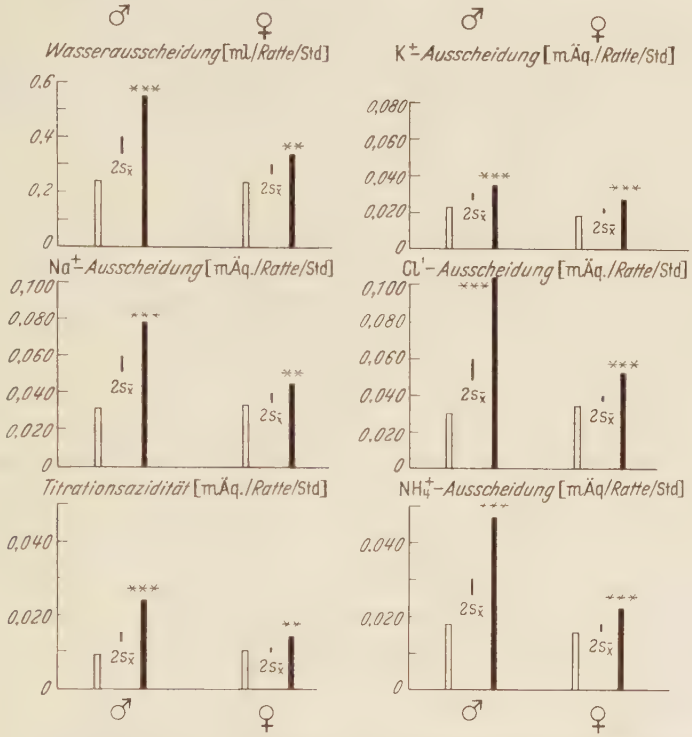


Abb. 2. *Wasser-, Mineral-, Gesamtsäure- und Ammoniakausscheidung durstender Ratten bei Tag und bei Nacht.*

Tagwerte weiße, Nachtwerte schwarze Säulen. Jede Säule stellt den Mittelwert aus 27—34 Einzelwerten dar. Die Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Tag- und Nachtharnsammelperioden sind wie in Abb. 1 bezeichnet. Die angegebenen Signifikanzen sind aus Streuungszerlegungen errechnet; z. B. für Wasser:

Art der Streuung	Freiheitsgrade, d. f.	Summe der Abweichungsquadrate, Sx^2	Varianz s^2	F	P
1. u. 2. Durstperiode	1	189,5442	189,5442	67,44	<0,001
1. u. 2. Versuchsgruppe	1	77,2902	77,2902	27,50	<0,001
Tag — Nacht	1	207,1612	207,1612	73,71	<0,001
Reststreuung	52	146,1436	2,8105		
Total	55	620,1392			

Der als Maß der Streuung angegebene Wert für 2 $s_{\bar{x}}$ ist jeweils aus der Summe der Abweichungsquadrate (Sx^2) nach Abzug der durch Unterschiede der 1. und 2. Durstperiode und der 1. u. 2. Versuchsgruppe bedingten Anteile errechnet.

Tabelle 1. *Maximale Diuresegeschwindigkeit von Ratten bei Tag und bei Nacht nach oraler Gabe von 10 + 8 ml Wasser oder von 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung*

Angaben in ml/Ratte/Std; Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Prüfung der Signifikanz der Tag-Nacht-Unterschiede durch Varianzanalyse (vgl. Methodik). Tierzahlen im Klammern

	„Wässerung" mit Wasser		„Wässerung" mit 0,9% NaCl-Lösung	
	♂	♀	♂	♀
Tag	7,24 ± 0,33(21)	7,58 ± 0,50(20)	2,99 ± 0,29(20)	3,37 ± 0.32(21)
Nacht	7.93 ± 0,42(20)	8,67 ± 0,48(21)	3.34 ± 0,39(20)	4,34 ± 0,42(21)
P	>0,10	>0,10	>0,10	<0,05

2. Gesamt-Kreatinin-Chromogen und echtes Kreatinin in Plasma und Harn

Die endogenen Kreatininblutspiegel einer Gruppe von 15 mit Körnerfutter ernährten Ratten sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Hierbei liegt die Konzentration des echten Kreatinins ebenso hoch wie sie von E. Muntwyler u. G. E. Griffin (1953) bei mit zusammengesetzter Kost ernährtern Ratten gefunden wurde, die Gesamt-Kreatinin-Chromogen-Konzentration aber etwas niedriger, so daß der Anteil des echten Kreatinins an der Gesamt-Kreatinin-Chromogen-Konzentration höher erscheint als bei Muntwyler u. Griffin (39%).

Tabelle 2. *Endogene Kreatinin-Blutspiegel bei einer Gruppe von mit Körnerfutter ernährten Ratten*

Jeweils Mittelwert $x \pm s_{\bar{x}}$, Zahl der Tiere in Klammern. Bestimmungsmethoden s. Methodik

Gesamt-Kreatinin-Chromogen	Echtes Kreatinin	
mg-%	mg-%	% des Gesamt-Kreatinin-Chromogens
0,669 ± 0,026(14)	0,352 ± 0,020(15)	48,2 ± 2,7(14)

Bei mit Latz-Rattenfutter ernährten Tieren lagen die *echten* Kreatinin-Blutspiegel signifikant höher als bei Körnerfütterung. Unterschiede in der Kreatinin-Konzentration bei Blutentnahme um 8 Uhr morgens oder um 20 Uhr abends bestanden bei männlichen Tieren nicht; bei den weiblichen Ratten war dagegen die echte Kreatinin-Konzentration morgens signifikant höher als abends und auch signifikant höher als bei männlichen Tieren am Morgen (Tab. 3).

Im Harn wurde bei 15 normalen Tieren nach Verdünnung das Gesamt-Kreatinin-Chromogen und das echte Kreatinin bestimmt. Der prozentuale Anteil des echten Kreatinins am Gesamt-Kreatinin-Chromogen betrug 100,3 + 2,3 ($\bar{x} + s_x$)%. Infolgedessen darf in Übereinstimmung mit E. Muntwyler u. G. E. Griffin (1953) angenommen werden, daß

Tabelle 3. *Konzentration von echtem Kreatinin im Plasma von ♂ und ♀ Ratten morgens um 8 Uhr bzw. abends um 20 Uhr*

Ernährung der Tiere mit gemahlenem Latz-Rattenfutter bei freier Wasseraufnahme. Jeweils $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Versuchszahlen in Klammern. P_1 = Signifikanz des Unterschieds zwischen den Blutspiegeln morgens und abends; P_2 = Signifikanz des Unterschieds zwischen den Mittelwerten bei ♂ und ♀

	♂	♀	P_2
20 Uhr	0,508 ± 0,034(11)	0,528 ± 0,020(12)	>0,10
8 Uhr	0,478 ± 0,011(14)	0,641 ± 0,024(13)	<0,001
P_1	>0,10	<0,01	

das gesamte Kreatinin-Chromogen im Harn normaler Ratten aus Kreatinin besteht. Bei den Bestimmungen der Kreatinin-Clearancen wurde infolgedessen *im Harn* im allgemeinen nur das Gesamt-Kreatinin-Chromogen mit alkalischer Pikratlösung bestimmt und auf die Bestimmung des im sauren Milieu an Fuller-Erde adsorbierbaren Anteils verzichtet.

3. Clearance des endogenen echten Kreatinins

Die Clearance des echten endogenen Kreatinins stimmt nach den Ergebnissen von Voruntersuchern (E. Muntwyler, G. E. Griffin 1953; D. Gribetz, K. van Loon, J. D. Crawford 1955) bei normalen Ratten und bei einer Reihe von Diätveränderungen sowohl mit der exogenen Kreatinin-Clearance als auch mit der Inulin-Clearance vollständig überein. Sie kann deshalb in gleicher Weise wie die Inulin-Clearance als Maß des Glomerulusfiltrats betrachtet werden. Bei Einleitung einer Wasserdiurese erweist sich die endogene 24-Stunden-Kreatinin-Clearance als Diurese-*un*abhängig (Tab. 4).

Bei männlichen Ratten ist nun die endogene Kreatinin-Clearance nachts gegenüber der Tagperiode signifikant und etwa im gleichen Ausmaß wie die Diurese bei freier Wasseraufnahme gesteigert (Abb. 1). Bei weiblichen Ratten hat dagegen die endogene Kreatinin-Clearence nachts den gleichen Wert wie bei Tag und weist auch während der Nachtperiode keine größere Streuung als bei Tag auf.

Ausscheidung von Natrium und Chlorid. Über die Ausscheidung von Natrium und Chlorid bei freier Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie bei Hunger und Durst während der Tag- und der Nachtperiode unterrichten Abb. 1 und Abb. 2. Während männliche Tiere unter allen diesen Umständen nachts viel mehr Natrium und Chlorid ausscheiden als bei Tag, läßt sich bei weiblichen Tieren bei freier Wasser- und Nahrungsaufnahme überhaupt kein sicherer Tag-Nacht-Unterschied nachweisen; bei Durst (und unter statistisch besseren Auswertungsbedingungen) läßt sich ein Unterschied nachweisen, der aber viel geringer als der bei männlichen Tieren vorhandene ist.

Tabelle 4. *Endogene Kreatinin-Clearance (echtes Kreatinin)* = $Cl_{Kr.\ endog.}$, *Diurese, und prozentualer Anteil des rückresorbierten Wassers am Glomerulusfiltrat* = R. R. *bei freier Wasser- und Nahrungsaufnahme und bei zusätzlicher wiederholter Gabe großer Wassermengen durch die Magensonde*

Die zusätzliche Wässerung bestand in der Gabe von 6 mal 8,0 ml dest. Wasser/Ratte im 4 Std-Abstand über die ganze Harnsammelperiode (24-Stundenperiode von 8 Uhr bis 8 Uhr). Angegeben ist jeweils der Mittelwert $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Versuchszahlen in Klammern

	♂			♀		
	$Cl_{Kr.\ endog.}$	Diurese	R.R.	$Cl_{Kr.\ endog.}$	Diurese	R.R.
	ml/Ratte/min	ml/Ratte/min	%	ml/Ratte/min	ml/Ratte/min	%
Freie Wasseraufnahme	1,24 ± 0,08(6)	0,0095 ± 0,0010(6)	99,2 ± 0,1(6)	0,90 ± 0,11(7)	0,0069 ± 0,0010(7)	99,2 ± 0,1(7)
Zusätzliche Wässerung	1,07 ± 0,06(6)	0,0294 ± 0,0014(6)	97,2 ± 0,3(6)	0,92 ± 0,05(7)	0,0344 ± 0,0019(7)	96,3 ± 0,3(7)

Die bei den männlichen Ratten eindeutigen, bei den weiblichen Ratten nur angedeuteten größeren Natrium- und Chloridausscheidungen während der Nacht sind renal bedingt, da die Na^+- und Cl^--Plasmaspiegel während der beiden Perioden keine Unterschiede aufweisen. Daraus resultiert eine gleichsinnige und gleichgroße Veränderung der Na^+- und Cl^--Clearance zwischen Tag und Nacht, die als Ausdruck der renalen Genese des beobachteten Unterschiedes in Abb. 1 wiedergegeben ist. Aus Abb. 1 ist weiterhin ersichtlich, daß die nächtliche prozentuale Zunahme der Na^+- und der Cl^--Clearance bei männlichen Ratten sehr viel größer ist als die Zunahme der endogenen Kreatinin-Clearance. Wenn die letztere als Maß des Glomerulusfiltrats angesehen wird, muß daraus auf eine Einschränkung der tubulären Rückresorption von Na^+ und Cl^- während der Nacht geschlossen werden.

Bei zur Bestimmung der Maximaldiuresegeschwindigkeit mit Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung „gewässerten" Ratten lassen sich im Gegensatz zu den besprochenen Befunden keine eindeutigen Tag-Nacht-Unterschiede der Na^+- und Cl^--Ausscheidung nachweisen.

Kalium-Ausscheidung. Die nächtlichen Ausscheidungssteigerungen (Abb. 1 und Abb. 2) sind sehr viel weniger ausgeprägt als die Na^+-Ausscheidungssteigerung. Die renale Genese der nächtlichen Ausscheidungssteigerung bei männlichen Tieren konnte nicht so eindeutig wie für Na^+ nachgewiesen werden: Da bei den frei trinkenden und ernährten Tieren die Ausscheidung im Harn signifikant gesteigert war, die Blutspiegel aber morgens um 8 Uhr etwas (aber nicht

signifikant) höher zu liegen schienen als abends um 20 Uhr, ließ sich eine Signifikanz des Unterschiedes der K^+-Clearance zwischen der Tag- und der Nachtperiode nicht nachweisen. Die K^+-Clearancen betrugen im allgemeinen rund $^1/_{10}$ des Glomerulusfiltrats. — Bei „gewässerten" Tieren zeigt die K^+-Ausscheidung ebensowenig wie die Na^+- und Cl^--Ausscheidung starke Unterschiede zwischen Tag und Nacht. Immerhin fanden wir bei ♀ mit 0,9 % NaCl-Lösung gewässerten Ratten eine Steigerung von 0,075 ± 0,005 (21) mÄq/Ratte/Std bei Tag auf 0,092 ± 0,006 (21) mÄq/Ratte/Std nachts.

Titrationsazidität und Ammoniumionenausscheidung. Bei durstenden und hungernden männlichen Tieren war sowohl die Ausscheidung von H^+-Ionen als auch von NH_4^+-Ionen während der Nachtperiode mehr als doppelt so groß wie über Tag (Abb. 2). Bei weiblichen Tieren bestand gleichfalls ein signifikanter Unterschied, der aber in seiner Größenordnung nur dem Unterschied der Kalium-Ausscheidung bei Tag und Nacht entsprach (Abb. 2).

Diskussion

Die Tag-Nacht-Unterschiede der Diurese sowie der Natrium- und Chloridausscheidung im Harn der Ratten sind zweifelsohne durch Veränderungen der Nierentätigkeit bedingt. Diese Veränderungen bestehen aber nicht in Unterschieden der renalen Ausscheidungs*fähigkeit* bei Tag und bei Nacht, da 1. die bei oraler Zufuhr von größeren Mengen Wasser oder NaCl gemessenen Ausscheidungsfähigkeiten bei Tag und bei Nacht nicht eindeutig unterschieden sind, und 2. die unter diesen Bedingungen beobachteten Ausscheidungen für Wasser, Na^+ und Cl^- erheblich höher liegen als die bei freier Wasser- und Nahrungsaufnahme (Abb. 1) oder bei Durst (Abb. 2) beobachteten Ausscheidungen. Somit *wird* nachts mehr Wasser und Salz ausgeschieden als bei Tag, obwohl während beider Perioden *noch* erheblich größere und für Tag und Nacht fast gleichgroße Mengen von Wasser und Salz ausgeschieden werden *könnten*. Unerklärt bleibt zunächst, warum bei freier Wasser- und Nahrungsaufnahme der nachts aufgenommene Wasserüberschuß nicht gleich, sondern anscheinend erst über den Tag verteilt wieder ausgeschieden wird (Abb. 1), obwohl die renale Ausscheidungsfähigkeit durch die Größe der nächtlichen Wasseraufnahme keineswegs erreicht wird.

Die bei männlichen Ratten beobachtete Steigerung der Diurese während der Nachtperiode kann *allein* als Folge der Zunahme des Glomerulusfiltrats erklärt werden, wenn man die endogene Kreatinin-Clearance als Maß des Glomerulusfiltrats ansieht. Da Glomerulusfiltrat und Diurese etwa im gleichen Ausmaß zugenommen haben und somit die Wasserrückresorption — ausgedrückt in Prozent des Glomerulusfiltrats — konstant geblieben sein muß, ergibt sich, daß die tubulär rückresorbierte

Wassermenge nachts gleichfalls höher liegen muß als am Tag. Bei weiblichen Ratten muß dagegen die nur bei einzelnen Tieren beobachtete (und deshalb nicht immer signifikante) höhere Wasserausscheidung während der Nachtperiode auf Schwankungen in der prozentualen Wasserrückresorption zurückgeführt werden, da bei ihnen die endogene Kreatinin-Clearance nachts weder zunimmt noch eine größere Streuung der Einzelwerte aufweist.

Während es bei der Wasser-, Na^+- und Cl^--Ausscheidung auf Grund der vorliegenden Befunde unwahrscheinlich ist, daß Plasmaveränderungen für die nächtliche Steigerung der renalen Exkretion verantwortlich gemacht werden müssen, läßt sich ein derartiger Zusammenhang für die Kalium-, Säure- und Ammonium-Ionen-Ausscheidung nicht ohne weiteres ausschließen. Der K^+-Plasmaspiegel ist vielleicht nachts zeitweilig leicht erhöht. Die Zunahme der Säure- und Ammonium-Ionen-Ausscheidung während der Nacht mag auf einer größeren endogenen Säureproduktion während der Aktivitätsperiode beruhen. Da sowohl die Ausscheidung von freier Säure und von Ammonium-Ionen als auch die Ausscheidung von Kalium als tubuläre Sekretionsvorgänge gedeutet werden, müssen die sehr viel größeren Tag-Nacht-Unterschiede der H^+- und NH_4^+-Ausscheidung gegenüber der K^+-Ausscheidung hervorgehoben werden.

Besonders auffällig erschienen die sehr viel geringeren Tag-Nacht-Schwankungen der weiblichen im Vergleich zu den männlichen Ratten. Die Neigung der weiblichen Tiere zur Konstanthaltung der renalen Exkretion während beider Perioden geht sogar so weit, daß ein stickstoffhaltiges Stoffwechselendprodukt, wie das Kreatinin, bei Weibchen (aber nicht bei Männchen) im Laufe der Nacht retiniert wird (Tab. 3). Vergleichbare Beobachtungen von anderen Tierarten und insbesondere von Menschen sind uns nicht bekannt. Ob dieser Geschlechtsunterschied ein einfaches sekundäres Geschlechtsmerkmal darstellt, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht entscheiden.

Zunächst muß die Frage offen bleiben, ob die Tag-Nacht-Unterschiede der Nierentätigkeit experimentell umkehrbar sind. Nicht entscheiden läßt sich bei der Ratte die Frage, ob sie mehr dem Wechsel von Aktivität und Ruhe oder dem Wach- und Schlafzustand korreliert sind; denn sowohl die physische Aktivität als auch Schlaf- und Wachzustand zeigen für die Ratte im Vergleich zum Menschen die gleiche umgekehrte Verteilung wie die Nierenfunktionen. Auch beim Menschen hat sich bisher nicht eindeutig entscheiden lassen, ob die Tag-Nacht-Unterschiede der Nierentätigkeit nur vom Schlaf- und Wachzustand abhängig sind (G. E. Simpson 1924, 1926, 1929; J. H. Sirota, D. S. Baldwin, H. Villareal 1950; J. Brod 1946) oder ob für ihr Zustandekommen auch körperliche Ruhe oder Arbeit eine Rolle spielen (M. Norn 1929).

Summary

1. Rats having free access to food and water, drink much larger quantities of water during the nigth than at day-time. While there is no difference between the two sexes in this respect, diuresis is considerably increased at nigth only in male rats. In female rats there is no increase of the mean values of diuresis during the night: only the range of values in every group appears larger for night-groups. The water balance is positive at night and negative during the day in males as well as in females. Differences between the rates of diuresis between day and night are not caused by the more pronounced differences in water intake: in rats deprived of water and food the differences between the day and night rates are more pronounced than under normal conditions. Under the conditions of water and food deprivation also. the differences in the rates of diuresis between day and night appear to be much more pronounced in males than in females.

2. The clearance of endogenous "true" creatinine (as determined by adsorption to Fuller's earth and subsequent elution) does not show any dependence upon the rate of diuresis under the conditions of intermittent water diuresis.

3. In male rats the clearance of endogenous "true" creatinine is increased during the night. In females there is no day-night-difference in endogenous creatinine clearances. Under the conditions of free access to food and water the increase in diuresis during the night period may be explained by the increase in GFR when it is assumed that the ratio of the volume of water reabsorbed by the tubules to GFR remains constant throughout. In animals deprived of food and water the tubular water reabsorption is probably depressed at nigth since the differences of diuresis are much larger under these conditions.

4. Urinary sodium and chloride excretions in male rats are much larger during the night than at day-time. In female rats this difference is either less evident or even absent. Since plasma levels of sodium and chloride are equal during both periods the diffeerences in the rates of excretion are of renal origin.

5. Potassium excretions in urine are also slightly increased during the night. This increase may be partially caused by changes in plasma levels.

6. Rats deprived of food and water excrete much more titratable acidity and more NH_4^+ ions at night than during the day. This difference also is less pronounced in females than ihn males.

Wir danken Herrn Dr. Dr. H. Kathen für die Ausführung eines großen Teils der Kreatinin-Bestimmungen. — Frl. E. Middendorf danken wir für technische Hilfe und die sorgfältige und fleißige Ausführung zahlreicher Bestimmungen.

Literatur

Borsook, H.: Micromethod for determination of ammonia, urea, total nitrogen, uric acid, creatinine (and creatine) and allantoin. J. of Biol. Chem. **110**, 481 (1935). — Brod, J.: Klinický význam filtrace a resorpce v ledvinách. Čas. lék. česk., **85**, 1315 (1946); zit. nach H. W. Smith: The Kidney. Oxford University Press, New York 1951, Seite 339. — Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Wirkung von Vasopressin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte bei Veränderungen der Salzkonzentration des Trinkwassers und nach Nierenparenchymresektionen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 434 (1956a). — Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Beeinflussung der renalen Wasser- und Salzausscheidung normaler und hypophysektomierter Ratten durch Nebennierenrindenhormone. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 578 (1956b). — Gribetz, D., K. van Loon and J. D. Crawford: Comparison of renal endogenous creatinine and inulin clearances in the rat. Amer. J. Physiol. **183**, 401 (1955). — Hare, R. S., and K. Hare: Determination of creatinine in blood and urine. Federat. Proc. **8**, 68 (1949). — Hare, R. S.: Endogenous creatinine in serum and urine. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 148 (1950). — Kingsley, G. R., R. R. Schaffert and M. Reiner: Creatinine. In M. Reiner Ed.: Standard Methods of Clinical Chemistry, Band 1. New York: Academic Press 1953. — Kuschinsky, G., H. Langecker: Eine mercurimetrische Bestimmung des Chlorids im Harn. Biochem. Z. **318**, 164 (1947). — Løken, F.: On the determination of creatinine in plasma by the Jaffé reaction, after adsorption to Lloyd's reagent. Scand. J. Clin. a. Labor. Invest. **6**, 325 (1954). — Manchester, R. C.: The diurnal rhythm in water and mineral exchange. J. Clin. Invest. **12**, 995 (1933). — Muntwyler, E. and G. E. Griffin: Creatinine clearance in normal and postassium deficient rats. Amer. J. Physiol. **173**, 145 (1953). — Norn, M.: Untersuchungen über das Verhalten des Kaliums im Organismus. II. Über Schwankungen der Kalium-, Natrium- und Chloridausscheidung durch die Nieren im Laufe des Tages. Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **55—57**, 184 (1929). — H. Popper, J. Brod: Die physiologischen Schwankungen der Nierenarbeit. Z. klin. Med. **134**, 196 (1938). — Pütter, A.: Die Dreidrüsentheorie der Harnbildung. Berlin 1926, Seite 158, zit. nach P. Ellinger: Die Absonderung des Harns unter verschiedenen Bedingungen einschließlich ihrer nervösen Beeinflussung und der Pharmakologie und Toxikologie der Nieren. In A. Bethe, G. v. Bergmann, G. Embden, P. Ellinger: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Band 4, Seite 364. Berlin: Springer 1929. — Simpson, G. E.: Diurnal variations in the rate of urine excretion for 2 hr intervals: some associated factors. J. of Biol. Chem. **59**, 107 (1924). — Simpson, G. E.: The effect of sleep on urinary chlorides and p_H. J. of Biol. Chem. **67**, 505 (1926). — Simpson, G. E.: Changes in the composition of urine brought about by sleep and other factors. J. of Biol. Chem. **84**, 393 (1929). — Sirota, J. H., D. S. Baldwin and H. Villareal: Diurnal variations of renal function in man. J. Clin. Invest. **29**, 187 (1950). — Snedecor, G. W.: Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. 4. Auflage. Ames, Iowa: The Iowa State College Press 1950.

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Mainz, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 495—504 (1956)

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)

Über Wirkungen von Blei im Intermediärstoffwechsel

Von
H. Baier, K. H. Bässler und K. Lang

(Eingegangen am 4. August 1956)

Die Bleivergiftung ist eine der häufigsten gewerblichen Vergiftungen. Über die Wirkung von Blei auf intermediäre Stoffwechselprozesse und damit auf die Energiegewinnung und -verwertung der Zelle liegt keine Literatur vor. Man findet lediglich Angaben über die Beeinflussung einzelner isolierter Enzyme. Es schien uns daher von Interesse, diesen Fragen nachzugehen. In vorliegender Arbeit wurde unter Verwendung von isolierten Mitochondrien, von Cyclophorasesystem und von Homogenaten der Einfluß von Blei auf den Citronensäurecyclus, die Fettsäureoxydation und die anaerobe Glykolyse untersucht.

Methodik

Die verwendeten Substrate gelangten als Kalium- oder Natriumsalze zur Anwendung.

Blei wurde als $PbCl_2$ zugefügt, wenn nicht anders angegeben in einer Endkonzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ m.

Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte nach Schneider in 0,25 m Rohrzuckerlösung. Als Suspensionsmedium für Mitochondrien verwendeten wir das von Hunter u. Ford angegebene nach geringer Modifikation. Es enthält folgende Komponenten (in Endkonzentrationen): KH_2PO_4 0,013 m; Trispuffer[1] 0,029 m; $MgSO_4$ 0,005 m; KCl 0,02 m; ATP 0,0018 m; Cytochrom c 0,015 μMol pro Ansatz.

Die Mitochondrien von 10 g Gewebe wurden in 10 ml dieses Mediums suspendiert. Von der Aufschwemmung kamen 0,5 ml pro Gefäß auf ein Gesamtvolumen von 2,0 ml. Jeder Ansatz enthielt also die Mitochondrien von 0,5 g Frischgewebe.

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme bzw. Kohlendioxydentwicklung erfolgte in üblicher Weise mit der Warburg-Methode. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Das nach Green dargestellte Cyclophorasesystem von 10 g Frischgewebe wurde in 10 ml 0,9%iger KCl-Lösung von pH 7,4 suspendiert. Die isolierte Untersuchung einzelner Reaktionsschritte im Citronensäurecyclus erfolgte ebenfalls nach Angaben von Green.

[1] Abkürzungen: Tris = Tris-(oxymethyl)-aminomethan; ATP = Adenosintriphosphat; DPN = Diphosphopyridinnucleotid; CoA = Coenzym A.

Die Untersuchung der Citratsynthese aus Acetat und Oxalacetat wurde nach der Versuchsanordnung von Stern u. Ochoa durchgeführt. Die Citronensäurebestimmung erfolgte nach McArdle; die Untersuchung der Oxalacetat-Decarboxylierung nach Ochoa; die Darstellung von Taubenleber-Acetontrockenpulver und Bestimmung der Sulfanilamid-Transacetylierung nach Kaplan u. Lipmann; die Sulfanilamidbestimmung nach Druey u. Oesterheld; die Hydroxamsäurebestimmung nach Lipmann u. Tuttle; die Acetessigsäurebestimmung jodometrisch nach Destillation als Aceton im geschlossenen Destillationsapparat nach Lang. Die Glykolyse wurde mit der üblichen Warburg-Technik gemessen unter Verwendung von 10%igem Leberhomogenat und des Inkubationsmediums von Stoesz u. LePage.

Die anaerobe Decarboxylierung von Brenztraubensäure wurde nach der Warburg-Methode bestimmt unter Verwendung von Bierhefe der Mainzer Aktienbrauerei, die auf der Zentrifuge ausgiebig mit destilliertem Wasser gewaschen wurde.

Ergebnisse

Da der Citronensäurecyclus an zentraler Stelle im Intermediärstoffwechsel steht, untersuchten wir zuerst die Wirkung von Blei auf die Oxydation von Gliedern des Citronensäurecyclus. Die Tab. 1—4 geben die Befunde wieder.

Tabelle 1. *Einfluß von Blei auf die Citratoxydation*

Ansatz: 0,5 ml Mitochondriensuspension, 25—50 μMol Substrat, aq. dest., Endvolumen 2,0 ml; im Einsatz 0,2 ml 2 n NaOH, Luft im Gasraum, p_H 7,2

Ansatz mit Cyclophorasesystem: 1,0 ml Cyclophorasesystem, 0,0033 m Arsenit, 1,0 ml 0,4 m Trispuffer p_H 7,2, sonst wie bei Ansätzen mit Mitochondrien

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std/mg N (Mitochondrien) bzw. pro 10 mg N (Cyclophorasesystem)			Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m	mit $1 \cdot 10^{-4}$ m	
Citrat	Mitochondrien	472	—	430	0
		368	271		27
		691	479		31
		574	356		38
	Cyclophorasesystem + Arsenit				
		50	60		0
		139	350		0

Wie Tab. 1 zeigt, wird die Sauerstoffaufnahme bei Verwendung von Citrat als Substrat durch Blei durchschnittlich um 30% gehemmt. Betrachtet man jedoch die Reaktionskette Citrat → β-Ketoglutarat isoliert, indem man Ketoglutarat mit Arsenit abfängt, so wird deutlich, daß die Hemmung auf einer späteren Stufe liegen muß. Aus den Beispielen in Tab. 2 geht hervor, daß die Oxydation von β-Ketoglutarat gehemmt wird.

Tabelle 2. *Einfluß von Blei auf die Oxydation von α-Ketoglutarsäure*
Ansatz mit Mitochondrien wie Tab. 1, Ansatz mit Cyclophorasesystem: 1,0 ml Cyclophorasesystem, 1,0 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4; 0,2 ml 0,02 m $MgSO_4$, Malonat in Endkonz. 0,033 m; sonst wie Tab. 1

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std/mg N			Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m	mit $1 \cdot 10^{-4}$ m	
Ketoglutarat	Mitochondrien	397	—	448	0
		610	420	—	31
		492	321	—	35
	Cyclophorase	106	35	—	67

Die Oxydation von Succinat und Malat ist, wie Tab. 3 zeigt, nicht beeinträchtigt.

Tabelle 3. *Einfluß von Blei auf die Oxydation von Succinat und Malat*
Ansatz: Wie Tab. 1

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std/mg N		Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei	
Succinat	Mitochondrien	420	438	0
		430	392	10
		412	365	10
		253	241	0
Malat		176	325	0
		194	241	0
		202	208	0
		239	371	0

Aus Tab. 4 ist dagegen eine vollständige Hemmung der Oxydation von Oxalacetat ersichtlich.

Tabelle 4. *Einfluß von Blei auf die Oxydation von Oxalacetat*
Ansatz wie Tab. 1. 5 μMole Oxalacetat als Substrat

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std/mg N		Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei	
Oxalacetat	Mitochondrien	148	0	100
		130	20	85

Eine Oxydation von Oxalacetat ist nur dann möglich, wenn ein Teil durch Decarboxylierung in Pyruvat übergeht und daraus entstandenes Acetyl-CoA sich mit restlichem Oxalacetat zu Citronensäure kondensiert. Die beobachtete Hemmung kann daher entweder am Übergang von Oxalacetat in Pyruvat oder an der Oxydation von Pyruvat liegen.

Das Beispiel in Tab. 5 unterrichtet darüber, daß die Decarboxylierung von Oxalacetat durch Blei nicht gehemmt wird.

Tabelle 5. *Einfluß von Blei auf die Decarboxylierung von Oxalacetat*

Ansatz: 1 ml Enzym (0,5 g Taubenleber-Trockenpulver mit 10 ml aq. dest. extrahiert), 0,5 ml $1{,}6 \cdot 10^{-3}$ m $MnSO_4$, 0,5 ml $4 \cdot 10^{-2}$ m Oxalacetat im Anhang; 0,5 ml 2 m Acetatpuffer p_H 5,0, aq. dest., Endvolumen 3,0 ml. Nach 5 min Temperaturausgleich (25°) wird das Substrat eingekippt

Substrat	Enzym (Taubenleber)	mm^3 CO_2-Entwicklung in 1 Std		Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei	
Oxalacetat	Taubenleber	142	146	0
		160	155	0

Die Oxydation von Pyruvat dagegen (Tab. 6) wird durch Blei stark gehemmt.

Tabelle 6. *Einfluß von Blei auf die Oxydation von Pyruvat*

Ansatz: wie Tab. 1 + 0,2 ml 0,25 m Na-bicarbonat

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std/mg N (Mitochondrien) bzw. pro 10 mg N (Cyclophorasesystem)		Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei	
Pyruvat	Mitochondrien	470	140	70
		282	9	97
	Cyclophorase	271	50	81

Da nun die Oxydation von Pyruvat einen außerordentlich komplexen Vorgang darstellt, erwächst die Aufgabe, den Ort dieser Hemmung genauer zu lokalisieren. Die Hemmung könnte das System der oxydativen Decarboxylierung, den Eintritt in den Citronensäurecyclus oder schließlich die Weiteroxydation im Citronensäurecyclus betreffen. Daß der letzte Punkt für die starke Hemmung nicht in Frage kommt, zeigen die oben besprochenen Befunde bei der Citratoxydation. Die Entscheidung zwischen den ersten beiden Möglichkeiten war nun per exclusionem möglich durch eine Reihe von Versuchen, denen wir folgendes Leitschema zugrunde legten (S. 499):

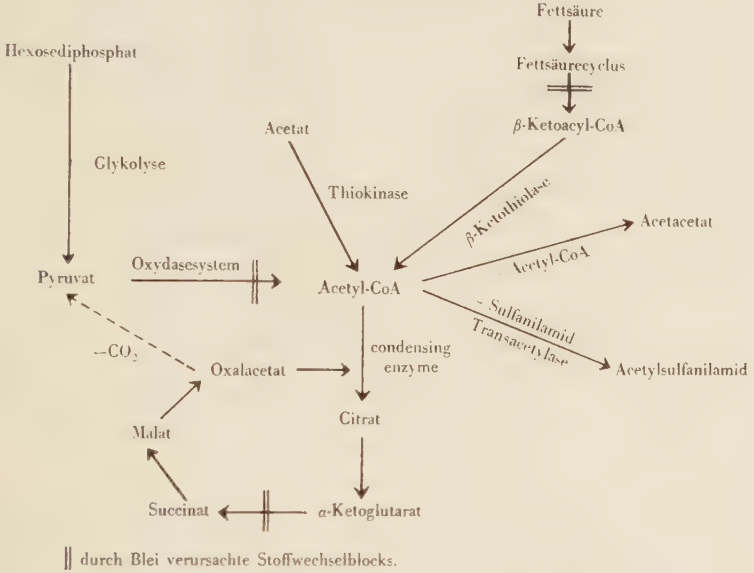
Zunächst ließ sich zeigen, daß die Acetatoxydation gehemmt ist, aber sehr wechselnd und meist schwach (Tab. 7).

Tabelle 7. *Einfluß von Blei auf die Oxydation von Acetat*

Ansatz: 0,5 ml Cyclophorasesystem; 50 μMol Acetat, 5 μMol Succinat als „sparker", 1 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4; 6 μMol ATP, 8 μMol $MgSO_4$, 0,03 μMol Cytochrom c, aq. dest., Endvolumen 2,0 ml

Substrat	Enzym (Cyclophorasesystem)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std/10 mg N		Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei	
Acetat	Kaninchenniere	2720	2505	10
		1239	777	38
		1500	1150	23

Da nun aber weder die Synthese von Citrat aus Acetat und Oxalacetat (Tab. 8), noch die Acetylierung von Sulfanilamid (Tab. 9) oder die Acetacetatbildung aus Acetat (Tab. 16) gehemmt ist, muß die Hemmung der Acetatoxydation im Citronensäurecyclus liegen (siehe Citratoxydation). Die durch die Fermente Thiokinase (aktivierendes Ferment), Sulfanil-



amid-Transacetylase, β-Ketothiolase und „condensing enzyme" katalysierten Reaktionen (s. Schema) können nicht betroffen sein. Die Hemmung muß im System der oxydativen Decarboxylierung liegen.

Tabelle 8. *Einfluß von Blei auf die Citratsynthese*
Ansatz: 1 ml Taubenleberextrakt in 0,02 m $NaHCO_3$, 1 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7,4, 45 μMole Oxalacetat, 60 μMole Acetat, 9 μMole ATP, 12 μMole $MgSO_4$, 30 μMole Cystein, 10 LIPMANN-Einheiten Coenzym A; aq. dest., Endvolumen 3,0 ml. Die Ansätze wurden 1 Std bei 37° C unter N_2/CO_2 geschüttelt

γ Citronensäure entstanden	
ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei
37	61
25	49
28	25

Tabelle 9. *Einfluß von Blei auf die Sulfanilamid-Acetylierung mit Acetat*
Ansatz: 1 ml Enzym (1 g Taubenleber-Trockenpulver mit 15 ml 0,02 m $NaHCO_3$ extrahiert), 100 μMol Acetat, 6 μMol ATP, 8 μMol $MgSO_4$, 2,5 μMol Cystein, 2 μMol Na-citrat, 0,8 ml 0,1 m Na-bicarbonat-Lösung, 1 ml 0,0008 m Sulfanilamid, 1 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7,4, Endvolumen 6,0 ml

γ Sulfanilamid acetyliert	
ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei
21,2	19,0
30,0	31,0
34,5	34,0

Die Richtigkeit dieses Schlusses wird noch bestätigt durch die in Tab. 10 und 11 demonstrierten Befunde, aus denen hervorgeht, daß sowohl die Acetylierung von Sulfanilamid, als auch die Acetacetatbildung durch Blei gehemmt wird, wenn man statt Acetat Pyruvat als Acetyl-Donator verwendet.

Um nähere Anhaltspunkte über den möglichen Angriffspunkt von Blei in dem komplizierten System der oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat zu gewinnen, wurden schließlich noch Versuche mit dem einfacheren System der Pyruvat-Decarboxylase von Hefe durchgeführt. Wie Tab. 12 zeigt, wird die anaerobe Decarboxylierung von Brenztraubensäure in Hefezellen durch Blei nicht gehemmt, sondern sogar aktiviert. Ein Angriff an der Cocarboxylase ist demnach hier ausgeschlossen und auch im System der oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat in der Leber unwahrscheinlich.

Tabelle 10. *Einfluß von Blei auf die Sulfanilamid-Acetylierung mit Pyruvat*
Ansatz: 1 ml Enzym (1 g Taubenleber-Trockenpulver mit 10 ml 0,033 m $MgSO_4$ extrahiert), 1,5 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4; 0,75 μMol DPN. 0,5 ml 0,0008 m Sulfanilamid, 50 μMol Pyruvat, aq. dest., Endvolumen 4,0 ml. 1 Std bei 37° geschüttelt

γ Sulfanilamid acetyliert	
ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei
25,4	9,7
55,0	44,0
32,0	25,0

Tabelle 11. *Einfluß von Blei auf die Acetacetatbildung bei der Oxydation von Pyruvat*
Ansatz wie Tab. 6

Mikromole Acetacetat entstanden	
ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei
8,1	2,5
6,0	2,0
7,5	3,1

Tabelle 12. *Einfluß von Blei auf die Pyruvat-Decarboxylierung durch Hefe*
Ansatz: 1 ml Hefesuspension mit 2—3 mg N, 0,5 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 5,6, 50 μMol Pyruvat, 5 μMol $MnSO_4$; aq. dest., Endvolumen 3,0 ml. Inkubation bei 37° unter 5% CO_2/95% N_2

Substrat	Enzym	mm^3 CO_2-Bildung in 1 Std	
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei
Pyruvat	Hefe	220	440
		390	410
		230	350
		210	400

Als nächster Bereich des Intermediärstoffwechsels wurde am Beispiel von Buttersäure und Capronsäure die Fettsäureoxydation untersucht. Wie Tab. 13 zeigt, verursacht Blei stets eine Hemmung der Fettsäureoxydation.

Tabelle 13. *Einfluß von Blei auf die Oxydation von Butyrat und Capronat* Ansatz wie Tab. 1; zusätzlich wurden noch 3 -5 μMol Succinat oder Malat als „sparker" zugefügt

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std/mg N (Mitochondrien) bzw. pro 10 mg N (Cyclophorasesystem)		Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ Blei	
Capronat	Mitochondrien	238	153	35
		272	0	100
		109	25	76
		434	317	27
		328	0	100
	Cyclophorase	193	59	70
Butyrat	Mitochondrien	224	22	90
		330	282	15
		185	156	16
		320	0	100

Um sicherzustellen, daß die Hemmung nicht bei der Weiteroxydation der Acetyl-CoA-Reste im Citronensäurecyclus liegt, wurde am Ende der Versuchszeit in den Ansätzen die entstandene Menge Acetacetat bestimmt. Diese müßte gegenüber den nicht mit Blei vergifteten Ansätzen höher sein, wenn die Hemmung im Citronensäurecyclus liegen würde, da ein Rückstau von C_2-Bruchstücken eine vermehrte Acetessigsäurebildung bedingt. Wie aus Tab. 14 ersichtlich ist, sind die Acetessigsäure-Werte der mit Blei vergifteten Ansätze aber niedriger, als bei den Kontrollen.

Tabelle 14. *Einfluß von Blei auf die Acetacetatbildung bei der Oxydation von Fettsäuren* Ansatz wie Tab. 13

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std/mg N		Hemmung %	Mikromole Acetacetat entstanden		Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei	
Capronat	Mitochondrien	434	317	27	4,7	3,8	20
		328	0	100	3,5	0	100

Die Ergebnisse zeigen, daß die Hemmung der Fettsäureoxydation nicht im Citronensäurecyclus, sondern vor der Acetessigsäurebildung gelegen sein muß. Die Bestimmung der Hydroxamsäurebildung aus den untersuchten Fettsäuren in Gegenwart von Hydroxylamin (Lipmann u. Tuttle) zeigt (Tab. 15), daß das aktivierende Ferment (die entsprechende Acyl-Thiokinase) durch die angewandten Bleikonzentrationen nicht gehemmt, sondern sogar leicht aktiviert wird.

Tabelle 15. *Einfluß von Blei auf die Hydroxamsäurebildung aus Fettsäuren*
Ansatz: 1 ml Homogenat bzw. 0,5 ml Cyclophorasesystem oder Mitochondrien, 50 μMol Substrat, 1,38 μMol CoA, 0,3 ml 2 m Hydroxylamin (p_H 7,0), Aq. dest., Endvolumen 3,0 ml. 1 Std bei 37° C geschüttelt

Substrat	Enzym (Rattenleber)	Mikromole Hydroxamsäure entstanden		Hemmung %
		ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei	
Capronat	Homogenat	3,90	4,08	0
	Mitochondrien	1,56	1,53	0
		1,57	1,65	0
Acetat	Cyclophorase	0,58	0,62	0

Die Acetacetatbildung aus Acetat (Tab. 16) wird durch Blei nicht gehemmt, sondern kräftig aktiviert.

Dies bedeutet im Verein mit dem Befund auf Tab. 9 (Sulfanilamid-Acetylierung, s. a. Leitschema) eine Aktivierung des Enzyms β-Ketothiolase.

Die Hemmwirkung von Blei auf den Fettsäurecyclus kann demnach nur die beiden Dehydrogenasen des Fettsäurecyclus oder die Enoyl-Hydratase (Crotonase) betreffen. Eine Entscheidung zwischen diesen 3 Möglichkeiten ist im komplexen Mitochondriensystem nicht möglich.

Tabelle 16. *Einfluß von Blei auf die Acetacetatbildung aus Acetat*
Ansatz: 2,0 ml Cyclophorasesystem, 2 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4, 50 μMol Acetat, 6 μMol ATP, 8 μMol $MgSO_4$, aq. dest., Endvolumen 8,0 ml

Mikromole Acetacetat entstanden nach 1 Std	
ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei
1,0	2,6
0,8	2,5

Tabelle 17. *Einfluß von Blei auf die Glykolyse*
Ansatz wie unter Methodik

$Q_M^{N_2}$ = mm³ CO_2-Entwicklung pro mg N und Std	
ohne Blei	mit $1 \cdot 10^{-3}$ m Blei
192	184
110	106

Als dritter Stoffwechselbereich wurde die anaerobe Glykolyse untersucht. Aus Tab. 17 ist zu entnehmen, daß die Glykolyse von Hexosediphosphat ab durch Blei nicht gehemmt wird. Demnach kann auch die Triosephosphatdehydrogenase nicht gehemmt sein.

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß durch Blei einzelne Reaktionen des Intermediärstoffwechsels, nämlich die oxydative Decarboxylierung von Brenztraubensäure und α-Ketoglutarsäure, sowie die Fettsäureoxydation gehemmt werden. Es geht daraus hervor, daß Blei in die Energiegewinnung der Zelle eingreift. Eine Erklärung der Bleivergiftung jedoch kann und soll mit diesen Befunden nicht versucht werden.

Die Hemmung im Fettsäurecyclus greift zwischen aktivierendem Ferment und β-Ketothiolase an. Eine genauere Lokalisation ist mit der hier angewandten Methodik nicht möglich.

Da zwischen dem Pyruvatoxydasesystem und dem α-Ketoglutaratoxydasesystem hinsichtlich der Cofaktoren weitgehende Analogie besteht, überrascht es nicht, daß beide Reaktionen durch Blei gehemmt werden; dieser Befund könnte sogar als Hinweis darauf gewertet werden, daß der Angriffspunkt der Hemmung an einem der Cofaktoren liegt. Ein Angriff am Coenzym A ist dabei unwahrscheinlich, da andere CaA-abhängige Reaktionen wie die Fettsäurenaktivierung und die verschiedenen von Acetat ausgehenden Reaktionen wie die Sulfanilamid-Acetylierung, Citratsynthese und Acetacetatbildung nicht gehemmt werden. Ein Angriff an der Cocarboxylase ist nach den Versuchen mit Pyruvat-Decarboxylase von Hefe unwahrscheinlich. Es bleibt die Möglichkeit einer Blockierung der Lipoinsäure durch Mercaptidbildung mit den beiden SH-Gruppen. Die Affinität von Blei zu den SH-Gruppen verschiedener Verbindungen ist bei der Mercaptidbildung unterschiedlich. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß typische SH-Fermente wie die Triosephosphat-Dehydrogenase (Glykolyse) und die β-Ketothiolase (Lynen u. Ochoa) unter unseren Versuchsbedingungen durch Blei nicht gehemmt werden.

Ein weiteres aus unseren Befunden abzuleitendes Ergebnis ist, daß die Atmungskette durch Blei nicht gehemmt wird. Das geht daraus hervor, daß die durch andere DPN- und TPN-abhängige Dehydrogenasen des Citronensäurecyclus verursachte Sauerstoffaufnahme durch Blei nicht beeinflußt wird.

Problematisch ist bei unseren Versuchen die aktuelle Konzentration an ionisiertem Blei. Es war zu erwarten, daß im Suspensionsmedium für Mitochondrien Blei als Phosphat oder Sulfat ausfallen würde. Dies war jedoch nicht der Fall. Vermutlich kommt es zu einer Komplexbildung zwischen Tris und Blei, die allerdings nur locker sein dürfte, da sich bei Bleibestimmungen mit der Dithizonmethode die gesamte Menge wieder in ionisierter Form finden läßt. Weiterhin wäre einzuwenden, daß eine Hemmung der Citratoxydation wegen Komplexbildung zwischen Citrat und Blei übersehen werden könnte. Dem steht jedoch entgegen, daß die α-Ketoglutarsäureoxydation auch in Gegenwart von Citrat gehemmt ist. Bei den Ansätzen mit Fettsäuren als Substrat wurde stets eine Trübung durch ausfallende Bleisalze beobachtet. Die Hemmung der Fettsäureoxydation aber auf eine Ausfällung der Fettsäuren in unlöslicher Form zurückführen zu wollen, wäre abwegig, da die gesamte Bleimenge von 2 μMol im Ansatz nur $^1/_{25}$ der Fettsäuremenge entspricht. Eine so geringe Änderung der Substratkonzentration wäre ohne Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme. Immerhin muß gesagt werden, daß möglicherweise wesentlich kleinere Konzentrationen an Blei eine Fermenthemmung verursachen

und daß die von uns angegebenen Endkonzentrationen Maximalwerte darstellen.

Bei einigen Reaktionen (Tab. 3, 8, 12 und 15) findet man leichte oder deutliche Aktivierung durch Blei. Derartige Aktivierungen durch geringe Bleikonzentrationen sind auch aus anderen Untersuchungen bekannt und nicht weiter verwunderlich, da zahlreiche enzymatische Reaktionen durch zweiwertige Ionen aktiviert werden, die sich darin in bestimmter Weise gegenseitig ersetzen können.

Summary

The effect of lead on the reactions of the citric acid cycle, the fatty acid cycle and on anaerobic glycolysis has been studied.

The oxidative decarboxylation of pyruvate and α-ketoglutarate is shown to be inhibited. The other reactions of the citric acid cycle are not inhibited.

The fatty acid oxidation is inhibited between the activation step and the β-ketothiolase reaction.

The anaerobic glycolysis of hexosediphosphate is not inhibited. The results indicate that the respiratory chain is unaffected by lead.

Dem Stifterverband für Nichteisenmetalle sind wir für die Unterstützung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Dem Zellstoffwerk Waldhof danken wir für die Überlassung von ATP, der Firma Mack, Illertissen, für die Überlassung von Cytochrom c.

Literatur

Druey, J., u. G. Oesterheld: Helvet. chim. Acta **25**, 753 (1942). — Green, D. E., W. F. Loomis and V. H. Auerbach: J. of Biol. Chem. **172**, 389 (1948). — Hunter jr., F. E., and L. Ford: J. of Biol. Chem. **216**, 357 (1955). — Kaplan, N. O., and F. Lipmann: J. of Biol. Chem. **174**, 37 (1948). — Lang, K.: Klin. Wschr. **1939**, 913. — Lipmann, F., and L. C. Tuttle: J. of Biol. Chem. **159**, 21 (1945). — Lynen, F., and S. Ochoa: Biochim. et Biophysica Acta **12**, 299 (1953). — McArdle, B.: Biochemic. J. **60**, 647 (1955). — Ochoa, S., A. H. Mehler and A. Kornberg: J. of Biol. Chem. **174**, 979 (1948). — Schneider, W. C.: J. of Biol. Chem. **176**, 259 (1948). — Stern, J. R., and S. Ochoa: J. of Biol. Chem. **179**, 491 (1949). — Stoesz, P. A., and G. A. LePage: J. of Biol. Chem. **180**, 587 (1949).

Prof. Dr. Dr. K. Lang, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Mainz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 505—512 (1956)

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Johannes-Gutenberg-Universität zu Mainz

Über das Schicksal von C^{14}-Benzoesäure und C^{14}-p-Chlorbenzoesäure im Organismus

Von
H. Lang und K. Lang

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. August 1956)

Im Zusammenhange mit der Verwendung von Benzoesäure bzw. substituierten Benzoesäuren als chemische Konservierungsmittel ist die Frage einer eventuellen Speicherung dieser Substanzen im Organismus und ihres Verhaltens im Stoffwechsel von Bedeutung.

Es ist schon lange bekannt, daß einverleibte Benzoesäure an Glykokoll zu Hippursäure gebunden und in dieser Form rasch und vollständig im Harn ausgeschieden wird. Bernhard u. Mitarb.[1] haben vor kurzem unter Verwendung von C^{11}-Benzoesäure gezeigt, daß peroral oder subcutan verabfolgte Benzoesäure innerhalb von 24 Std nahezu vollständig im Harn ausgeschieden wird. Weiterhin konnten sie wahrscheinlich machen, daß Benzoesäure im Organismus nicht weiter verändert wird. Das ausgeatmete Kohlendioxyd war nur ganz geringfügig radioaktiv, und nach Verabreichung von deuterierter Benzoesäure hatte die im Harn ausgeschiedene Benzoesäure, abgesehen von der durch die Eigenproduktion der Substanz im Stoffwechsel bedingten Isotopenverdünnung, denselben Deuteriumgehalt wie die verabfolgte. Immerhin war durch diese Versuche nicht ausgeschlossen, daß sich Benzoesäure im Organismus in bestimmten Organen anreichert, zumal da durch den Verteilungskoeffizienten der Substanz zwischen Wasser und organischen Lösungsmitteln eine Speicherung in lipoidreichen Organen durchaus denkbar wäre. Wir haben daher die Frage einer eventuellen Speicherung unter Verwendung von C^{14}-Benzoesäure zu klären versucht und unsere Untersuchungen auch auf die p-Chlorbenzoesäure ausgedehnt.

Methodik

1. Benzoesäure-Präparate. Es wurden verwandt Benzoesäure ($C^{14}OOH$) mit einer spezifischen Aktivität von 10,8 mC/g und p-Chlor-benzoesäure ($C^{14}OOH$) mit einer spezifischen Aktivität von 13,7 mC/g.

Abgewogene Teile wurden unter vorsichtiger Zugabe von 0,1 n NaOH in Wasser gelöst und ein p_H von 7,0 –7,5 eingestellt. Nach Filtration durch eine Fritte G 4

wurden die Lösungen im Eisschrank aufbewahrt. Die Dosis von 50 mg war in 0,65 bis 1,0 ml Lösung enthalten. Von den Lösungen wurden aliquote Teile entnommen, in Meßkolben verdünnt und davon mehrere Meßpräparate zur Standardisierung der Lösungen mit je 1 ml gesättigter $Ba(OH)_2$-Lösung eingetrocknet und gemessen.

2. Radioaktive Messungen. Die Messungen erfolgten mit einem Endfenster-Zählrohr der Fa. Frieseke und Hoepfner, Erlangen, mit einer Glimmerfolie von 1,6 mg/cm². Abschirmung, gleiche Lage und gleicher Abstand der Präparate waren exakt gewährleistet Die Zählrohrleistung wurde mit einem Uran- und einem C^{14}-Standard überprüft. Durch Mehrfach-Messungen wurden Netzschwankungen ausgeschaltet.

3. Tierversuche. Es wurden Albinoratten beiderlei Geschlechts im Gewicht von 140—230 g verwandt. Die Tiere erhielten die auf Körpertemperatur vorgewärmte Dosis von 50 mg (in 0,65—1,0 ml) aus einer Tuberkulinspritze in die Bauchhöhle injiziert. Die Tiere wurden bis zur Tötung an einem gut gelüfteten Ort in Stoffwechselkäfigen untergebracht; der Kot wurde durch ein engmaschiges Drahtsieb aufgefangen, der Urin in einem Erlenmeyer-Kolben, der 5 ml 1 n NaOH enthielt. Kot und Urin wurden täglich entfernt.

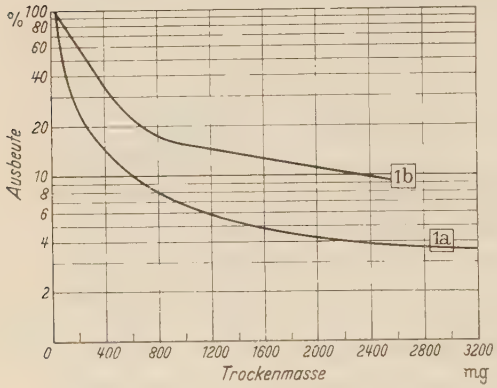


Abb. 1. 1a Selbstabsorptionskurve für C^{14} in eingetrockneten Rattengewebshomogenaten. 100% Ausbeute für den Leerwert mit 37 mg Trockenmasse angesetzt. 1b Selbstabsorptionskurve für C^{14} in den Trockenrückständen von Ätherextrakten von Rattengeweben. 100% Ausbeute für den Leerwert mit Trockenmasse kleiner als 20 mg angesetzt

4. Nachweis der Radioaktivität in den Gesamtorganen. Nach verschiedenen Zeiten (1—23 Tage) wurden die Ratten nach dem Abwiegen durch Genickschlag getötet und durch Auftrennen der Carotis entblutet. Die Kadaver wurden sofort zerlegt und die verschiedenen Gewebe nach dem Abspülen mit Wasser weiter verarbeitet. Da in Vorversuchen festgestellt wurde, daß die Radioaktivität der einzelnen Gewebe zu klein war, um diese nach Veraschen der Gewebe und Fällung des CO_2 als $BaCO_3$ zu messen, wurde trotz theoretischer Bedenken die Radioaktivität in den Homogenaten der Gewebe direkt gemessen. Zur Korrektur der Selbstabsorption wurde eine Eichkurve angelegt, indem verschiedene Mengen von Homogenaten verschiedener Organe mit je 1 ml gesättigter $Ba(OH)_2$-Lösung und 0,054 μC C^{14}-Benzoesäure in gewogenen flachen Glasschälchen von 40 mm Dnrchmesser vermischt und bei 70° C eingetrocknet wurden. Vor dem vollständigen Trockenwerden wurde nach Zugabe von je 1 ml Aceton mit einem Glasknopf die Schicht geglättet und dann fertig getrocknet. Durch Vermessung von 35 verschiedenen Proben mit Trockenmassen von 35—4300 mg verschiedener Organe wurde eine befriedigend genaue Kurve für die Selbstabsorption von C^{14} in Rattengewebs-Homogenaten erhalten (Abb. 1a). Die Werte aller Homogenate lagen befriedigend auf der Kurve, die mittlere Abweichung der Meßpunkte von der Kurve betrug $\pm$ 5,1%. Als Wert für 100% Ausbeute wurde die Aktivität der Proben ohne Gewebe mit nur 1 ml gesättigter $Ba(OH)_2$-Lösung und 0,054 μC C^{14}-Benzoesäuse (mittlere Trockenmasse 37 mg) eingesetzt, da die Extrapolation der Kurve gegen 0 mg wegen der Steilheit dieses Kurventeils zu ungenau gewesen wäre. Die

Rattengewebe wurden im Ganzglashomogenisator total oder zu abgewogenen, aliquoten Teilen unter Zusatz von 1 ml gesättigter $Ba(OH)_2$-Lösung homogenisiert. Festere Gewebe, wie Muskulatur usw. wurden vorher in einer Porzellanschale mit der Schere gut vorzerkleinert. Knochen wurden nach Zusatz der $Ba(OH)_2$-Lösung in einer Reibschale mit dem Pistill zerkleinert und zu einem möglich feinen Brei verrieben. Der Kot wurde gut homogenisiert, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und von der gut durchgerührten Suspension je 1 ml zur Analyse gebracht. Der Urin wurde auf

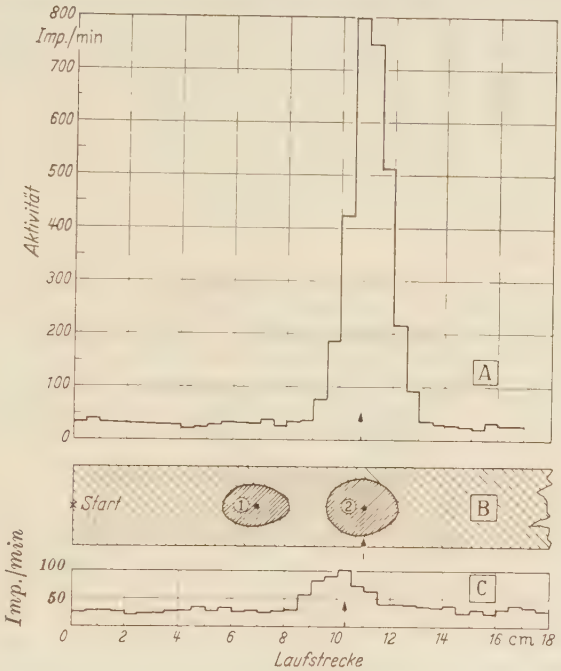


Abb. 2. Papierchromatographie der Ätherextrakte aus Rattengeweben (Methode siehe Text). *A* Radioaktivität im Chromatogramm von 7 γ C^{14}-Benzoesäure. *B* Wiedergabe des Chromatogramms von 1. 50 γ Hippursäure und 2. 50 γ Benzoesäure. *C* Radioaktivität im Chromatogramm der gereinigten Ätherextrakte aus Rattengewebe

500 ml aufgefüllt und mehrmals je 0,5 ml zur Analyse gebraeht. Die Aktivität der Haut konnte auf diese Weise nicht gemessen werden. Alle Homogenate wurden genau so behandelt, wie bei der Anlage der Eichkurve beschrieben und gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 und 2 dargestellt.

5. Nachweis der Radioaktivität in den Ätherextrakten der Rattenorgane. Die Versuchstiere wurden, wie unter 4. beschrieben, getötet und zerlegt, die Gewebe total oder zu aliquoten Teilen in Bechergläser überführt und mit 10%iger NaOH 1 Std lang bei 100° C hydrolysiert, wobei das verdampfende Wasser wieder ersetzt wurde. Die Hydrolysate, die praktisch keine festen Teile mehr enthielten, wurden nach Erkalten in Kutscher-Steudelsche Extraktoren eingefüllt, mit 20%iger HCl angesäuert und 20 Std lang mit 50 ml reinen Äthers extrahiert. Die Ätherphase wurde mit geglühtem Na_2SO_4 24 Std getrocknet und dann filtriert, wobei die Na_2SO_4-Rückstände mit 50 ml trockenen Äthers gut ausgewaschen wurden. Die vereinigten Lösungen wurden danach im Vakuum auf dem Sandbad von etwa 40° C eingedampft,

bis ein Rückstand von etwa 2—3 ml verblieb; dieser wurde in gewogene Schälchen überführt und die Kolben mehrmals mit je 1 ml trockenem Äther gut ausgespült. Nach Verdunsten des Äthers wurde nach Zugabe von 1 ml trockenem Aceton die Schicht geglättet und dann bei 70° C fertig getrocknet und nach dem Wiegen gemessen. Ergebnisse in Tab. 3.

Hier wurde ebenfalls eine Selbstabsorptions-Eichkurve angelegt, indem steigende Mengen von NaOH-Hydrolysaten verschiedener Organe mit je 0,054 μC C^{14}-Benzoesäure in die Extraktoren gefüllt und nach Ansäuern, wie oben beschrieben, extrahiert, die Ätherphasen getrocknet, filtriert und eingedampft wurden. Diese Selbstabsorptions-Kurve für C^{14} in den Rückständen von Ätherextrakten der Rattenorgane

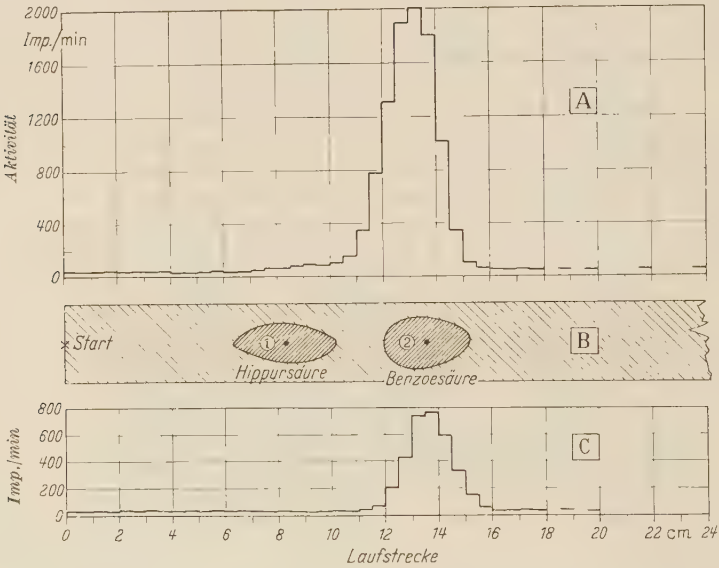


Abb. 3. Papierchromatographie der Ätherextrakte von Rattenkot. *A* Radioaktivität im Chromatogramm des gereinigten Ätherextraktes von Rattenkot. *B* Wiedergabe des Chromatogramms von 1. 50 γ Hippursäure und 2. 50 γ Benzoesäure. *C* Radioaktivität im Chromatogramm von 7 γ C^{14}-Benzoesäure

ist nicht identisch mit der Selbst-Abs-Kurve in den Homogenaten (Abb. 1b). Auch hier lagen alle Meßpunkte (13 Stück) befriedigend genau auf der Kurve. Als Wert für 100% Ausbeute wurde die Aktivität der Rückstände von 0,054 μC C^{14}-Benzoesäure und 10 mg inaktiver Benzoesäuse ohne Gewebshydrolysat (mittlere Trockenmasse 8 mg) eingesetzt.

6. Papierchromatographische Untersuchung der Ätherextrakt-Rückstände. Die Rückstände der Ätherextraktion in den Meßschälchen wurden wieder in Äther gelöst und gesammelt. Alle Organwerte von 4 Ratten wurden vereinigt. Diese Ätherlösungen, aus denen beim Stehen gelbe Produkte ausgefallen waren, wurden 3mal mit gesättigter $KHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt, wobei beide Phasen ganz klar wurden, so daß keine ungelösten Stoffe verblieben. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit 3 Tropfen 10%iger NaOH alkalisch gemacht und 3mal rückwärts mit Äther ausgeschüttelt, um möglichst viel Fett zu entfernen. Die wäßrigen Phasen wurden mit 20%iger HCl angesäuert und 2mal mit Äther ausgeschüttelt; die Ätherlösungen wurden vereinigt und noch einmal der eben beschriebenen Prozedur

wie die Ausgangslösungen unterworfen. Die anfallende, nun fast fettfreie Ätherlösung wurde über Nacht mit geglühtem Na_2SO_2 getrocknet und im Vakuum beinahe bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand, ein gelbbraunes Öl, wurde in wenig Äther aufgenommen und fast quantitativ auf das Papierchromatogramm aufgebracht. Eine Eintages-Portion Rattenkot wurde ebenfalls mit NaOH hydrolysiert, mit Äther extrahiert, nach dem oben angegebenen Schema aufgearbeitet und die Rückstände der $KHCO_3$-Extraktion chromatographiert. Die Chromatographie erfolgte auf Whatman Nr. 1, Lösungsmittel n-Butanol, gesättigt mit 1,5 n NH_4OH, Laufrichtung absteigend, Laufzeit 20—26 Std, Temperatur um 25° C. Als Vergleichswerte wurden je 50 γ Benzoesäure und Hippursäure, sowie 7 γ C^{14}-Benzoesäure auf dem gleichen Bogen mitchromatographiert. Zur Messung der Radioaktivität wurde ein 4 cm breiter Streifen aus den Chromatogrammen ausgeschnitten, auf eine gleich breite Glasplatte straff aufgeklebt, die in eine Metallschiene eingeschraubt wurde, welche unter dem Zählrohr durchgeschoben werden konnte. Das Zählrohr wurde durch eine 1 mm dicke Bleifolie abgeschirmt, in der ein 5 mm breiter und 25 mm langer Ausschnitt war. Ein in die Metallschiene eingeritzter Maßstab ermöglichte es, den Streifen in Abschnitten von 0,5 cm fortlaufend durchzumessen. Ergebnisse in Abb. 2 und 3.

Um zu prüfen, ob die $KHCO_3$-Extraktion quantitativ verlaufen war und keine Substanzen übersehen worden waren, wurden die nach der $KHCO_3$-Extraktion verbliebenen Ätherlösungen mit Wasser ausgeschüttelt, auf je 20 ml aufgefüllt und aliquote Teile auf die Aktivität untersucht. Es zeigte sich, daß in den Ätherlösungen der Organextrakte 4%, in denen der Kotextrakte 1% der vorher vorhandenen Aktivität verblieben war.

Ergebnisse und Diskussion der Befunde

Unsere Befunde über die Verteilung der C^{14}-Benzoesäure nach i.p. Injektion in den Organen von Ratten sind in der Tab. 1 zusammengestellt. In Übereinstimmung mit Bernhard u. Mitarb.[1] ergaben unsere Versuche, daß verabreichte Benzoesäure innerhalb von 1—2 Tagen praktisch quantitativ im Harn ausgeschieden wird. Im Kot fanden wir nur eine geringe Radioaktivität. Die Radioaktivität der untersuchten Organe war äußerst gering. Sie lag maximal in der Größenordnung der hundertstel Prozente der applizierten Dosis. Im Gehirn war sie trotz der hohen verabreichten Aktivität von rund 500 μC für die etwa 200 g schweren Tiere gerade eben an der Grenze der Nachweisbarkeit (Größenordnung von 10^{-4} % der Dosis). Im Verlauf von 8—23 Tagen nahm die Aktivität in den Organen immer weiter ab und wurde dann praktisch unmeßbar klein. Etwas höhere, aber immer noch verschwindend kleine Aktivitäten wurden in Depotfett gemessen. Aber auch hier nahm die Radioaktivität im Verlaufe der Zeit rasch ab.

Zur Feststellung, ob die in den Organen gemessene Aktivität auf den Gehalt an Benzoesäure zurückzuführen ist oder ob Umwandlungsprodukte derselben nachweisbar sind, haben wir in einer zweiten Versuchsserie die Aktivitäten nicht in den Organhomogenaten, sondern in den Ätherextrakten derselben gemessen. Es zeigte sich, daß praktisch die gesamte Radioaktivität der Homogenate in den Ätherextrakt

überging (siehe auch Tab. 2). Wir haben dann die Ätherextrakte vereinigt und einer Papierchromatographie unterworfen. Diese ergab nur einen einzigen Flecken, der radioaktiv war und auf Grund seines R_f-Wertes (Kontrolle durch mitlaufende Benzoesäure) als Benzoesäure identifiziert wurde (Abb. 2 und 3). Die gesamte Radioaktivität der Organe und des Depotfettes ist also nur durch den Gehalt an Benzoesäure bedingt. Ein

Tabelle 1. *Verteilung von Benzoesäure in Ratten nach intraperitonealer Applikation.* Werte in Prozenten der applizierten Dosis. Fehlerbreite: Urin ± 5%, Kot ± 20%, andere Werte ± 50%. Im *Homogenat* wiedergefundene Werte

Organ	nach 1 Tag	nach 2 Tagen		nach 4 Tagen	nach 8 Tagen	nach 23 Tagen
Urin . . .	93 98	102 104	107	—	—	—
Kot . . .	0,8	3,1	1,7	1,0	—	—
Blut . . .	0,009	0,004	0,007	0,002	≤ 0,002	≤ 0,001
Leber . .	0,02	0,009	0,008	0,004	0,004	≤ 0,0006
Nieren . .	0,003	0,002	0,002	0,0008	≤ 0,0005	≤ 0,0001
Darm . .	—	—	0,01	—	0,004	≤ 0,0003
Milz . . .	—	≤ 0,0001	—	—	—	—
Lunge . .	0,001	—	0,001	—	≤ 0,0001	—
Fett um Nieren .	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	0,002
Muskulatur	0,05	0,04	0,03	0,08	0,03	≤ 0,007
Skelet . .	—	—	—	0,008	≤ 0,003	—
Gehirn . .	≤ 0,0003	0,0005	≤ 0,0002	≤ 0,0001	≤ 0,0001	≤ 0,0001
Haut (mit Fett)* .	0,3	0,1	0,2	—	0,09	0,02

* Die Werte für die Haut sind im Ätherextrakt gefunden, da kein Homogenat möglich.

Umsatz der Benzoesäure zu anderen Substanzen findet im Zellstoffwechsel nicht statt. Etwa vorhandene Hippursäure wäre bei der Organaufarbeitung allerdings zu Benzoesäure verseift worden. Es könnte demnach sein, daß die Benzoesäure in den Zellen ganz oder teilweise in Form der Hippursäure vorliegt.

Versuche mit C^{14}-p-Chlorbenzoesäure führten zu denselben Befunden (Tab. 3). Auch p-Chlorbenzoesäure wird innerhalb eines Tages praktisch quantitativ im Harn ausgeschieden. Im Kot fanden sich nur 2% der verabreichten Dosis. Auch der Gehalt der Organe lag in derselben Größenordnung wie nach Verabreichung von Benzoesäure. Wiederum war die Radioaktivität trotz der größeren Lipoidlöslichkeit der chlorierten Säure im Gehirn nahezu unmeßbar klein; im Depotfett war sie am größten. Unsere Befunde stehen im Einklang mit Ergebnissen, die von Hecht mittels chemischer Analyse erhalten worden waren.

Auch HECHT konnte keine Speicherung von p-Chlorbenzoesäure im Organismus nachweisen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß Benzoesäure und p-Chlorbenzoesäure von den Organzellen nicht in meßbaren Umfange aufgenommen

Tabelle 2. *Verteilung von Benzoesäure in Ratten nach intraperitorealer Applikation.* Werte in Prozenten der applizierten Dosis. Fehlerbreite: Urin ± 5%, Kot ± 20%, andere Werte ± 50%. Im *Ätherextrakt* wiedergefundene Werte

Organ	nach 1 Tag	nach 2 Tagen	
Urin	92	102	89
Kot	0,9	1,4	0,6
Blut	0,01	0,004	0,006
Leber	0,02	0,005	0,01
Nieren	0,009	0,009	0,002
Darm	—	—	0,03
Lunge	—	—	0,001
Fett um Nieren	0,01	0,007	0,02
Skelet	0,03	—	—
Gehirn	0,0003	—	≤ 0,0002
Haut (mit Fettschicht)	0,3	0,1	0,2

Tabelle 3. *Verteilung von p-Chlorbenzoesäure in Ratten nach intraperitonealer Applikation.*
Werte in Prozenten der appl. Dosis. *H* = im Homogenat wiedergefunden, *E* = im Ätherextrakt wiedergefunden. Fehlerbreite: Urin ± 5%, Kot ± 20%, andere Werte ± 50%

Organ	nach 1 Tag	nach 2 Tagen	nach 8 Tagen
Urin	83 *H*	—	—
Kot	2,0 *H*	—	—
Blut	0,04 *H*	0,02 *H*	0,004 *H*
Leber	0,08 *H*	0,03 *H*	0,01 *H*
Nieren	0,02 *H*	0,009 *H*	0,003 *H*
Darm	0,05 *H*	0,02 *H*	0,009 *H*
Lunge	0,003 *H*	0,002 *H*	—
Fett um Nieren	0,05 *H*	0,04 *H*	0,04 *H*
Muskulatur	0,2 *H*	0,08 *H*	0,1 *H*
Skelet	—	0,04 *H*	0,02 *H*
Gehirn	0,0009 *H*	≤ 0,0005 *H*	≤ 0,0002 *H*
Haut (mit Fettschicht)	0,4 *E*	0,2 *E*	0,1 *E*

werden, sondern der Hauptmenge nach extracellulär bleiben. Auf Grund der Beschränkung der Substanzen auf den extracellulären Raum erfolgt dann die rasche Ausscheidung im Harn. Die Paarung mit Glykokoll zu Hippursäure findet in der Niere statt[2]. Eine Schädigung der Organzellen durch Benzoesäure oder p-Chlorbenzoesäure oder ein wesentlicher Eingriff dieser Substanzen in den Zellstoffwechsel erscheint daher bei der gewählten Dosis von rund 200—250 mg/kg als äußerst unwahrscheinlich, da eine meßbare Konzentration nicht erreicht wird.

Zusammenfassung

C^{14}-Benzoesäure und C^{14}-p-Chlorbenzoesäure werden nach i.p. Injektion von Ratten innerhalb kurzer Zeit praktisch quantitativ ausgeschieden. In den Organen werden nur äußerst geringe Bruchteile (10^{-2} bis 10^{-4} Prozente) der verabreichten Dosis gefunden. Eine nennenswerte Speicherung der Substanzen im Organismus findet demnach nicht statt. Die gesamte in den Organen nachweisbare Aktivität lag bei dem Versuch mit C^{14}-Benzoesäure in Form der unveränderten Benzoesäure vor.

Literatur

[1] Bernhard, K., I. P. Vuilleumier u. G. Brubacher: Helvet. chim. Acta **38**, 1438 (1955). — [2] Zusammenfassung der älteren Literatur bei K. Fromherz: im Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Band V. S. 996. Berlin 1928. — Hecht, G.: Briefliche Mitteilung.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 513—519 (1956)

Aus der Urologischen Universitätsklinik Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. C. E. Alken)
und der Medizinischen Universitätsklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. H. Reinwein)

Über die Beeinflussung der Tubulusfunktion bei der Nierenausscheidung des 4-Sulfanilamido-2,6-dimethyl-pyrimidins

Von
F. Portwich und H. Büttner

(Eingegangen am 10. September 1956)

Die renale Elimination eines Stoffes aus dem Blut erfolgt zunächst durch Glomerulusfiltration, kann aber auch noch durch aktive Vorgänge in den Tubuli, sei es Rückresorption oder Sekretion, beeinflußt werden. Bei Stoffen, die nicht an die Bluteiweißkörper gebunden sind, gestattet die Bestimmung des Clearance-Ratio,

$$\text{Cl. R.} = \frac{\text{Clearance der untersuchten Verbindung (ml/min)}}{\text{Glomeruläres Filtrationsvolumen (ml/min)}},$$

eine sichere Entscheidung, ob die Ausscheidung durch Sekretion, Rückresorption oder reine Filtration bewirkt wird. Bei eiweißgebundenen Substanzen tritt an die Stelle des Cl. R. das Ausscheidungsverhältnis (sogenannte „excretion ratio" = E. R.):

$$\text{E.R.} = \frac{\text{Clearance des ultrafiltrablen Anteils der untersuchten Verbindung (ml/min)}}{\text{Glomeruläres Filtrationsvolumen (ml/min)}}.$$

Während die E. R. eine Unterscheidung zwischen Filtration und Rückresorption (E. R. kleiner als 1), Filtration und Sekretion (E. R. größer als 1), sowie reiner Filtration (E. R. gleich 1) erlaubt, ist es nicht möglich, durch die Bestimmung der E. R. das gleichzeitige Vorliegen von Sekretion und Rückresorption neben der Filtration zu erkennen.

Barclay, Cooke u. Kenney wiesen als erste darauf hin, daß ein solches „Drei-Komponenten-System" durch Untersuchung der E. R. bei verschiedenen Plasmakonzentrationen analysierbar ist. Die aktiven Vorgänge der Nierenausscheidung, Sekretion und Rückresorption, lassen sich gegebenenfalls auch durch Hemmung der Tubulusfunktion ermitteln. Neben einer spezifischen Hemmung, etwa durch Vergiftung der an diesen Vorgängen beteiligten Fermentsysteme, ist eine sogenannte kompetitive Hemmung der tubulären Transportmechanismen durch Verbindungen möglich, die bei dem aktiven Prozeß mit der zu untersuchenden Substanz in den Tubuli konkurrieren.

Für einen großen Teil der Sulfonamide ist die E. R. kleiner als 1, so daß neben der Filtration auf das Vorliegen von besonderen Rückresorptionsvorgängen geschlossen werden kann. Für einige Sulfonamide, bei denen die E. R. über 1 lag,

wurde in neuerer Zeit eine Tubulus-Sekretion angenommen. Beim Menschen werden wahrscheinlich Sulfathiazol (Lundquist), Acetyl-Sulfathiazol (Reinhold u. Mitarb.), Sulfamethylthiodiazol (Lundquist sowie Lindahl u. Josephson), Sulfaäthylthiodiazol (Witzgall, berechnet nach Clearance-Werten von Frisk) und Acetyl-Sulfamerazin (Earle sowie Reinhold u. Mitarb.) zusätzlich durch Tubulus-Sekretion ausgeschieden.

Für das 4-Sulfanilamido-2,6-dimethyl-pyrimidin[1] („4-Sulfadimethylpyrimidin") und sein Acetyl-Derivat haben wir die E. R. beim Menschen aus früher ermittelten Clearance-Ergebnissen berechnet. Obwohl diese E. R.-Werte etwa 1 betragen, konnten wir durch experimentelle Hemmung der tubulären Funktion auf verschiedene Weise eine Senkung der Cl. R. erreichen.

Methodik

1. Die Bestimmung des freien und acetylierten 4-Sulfadimethylpyrimidins sowie des 2-Sulfa-4-methylpyrimidins („Sulfamerazins") erfolgte nach der Methode von Krebs u. Franke, die Durchführung und Berechnung der Clearance-Versuche in der von uns bereits früher durchgeführten Art (Portwich, Büttner u. Paulini). Die Hemmung der Tubulusfunktion wurde erreicht mit:

a) p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid (Bénémide [Wz.] Theraplix). Zwei Tage vor der Clearance und am Clearance-Tage je 3 g peroral.

b) p-Carboxy-benzolsulfo-diäthylamid (Longacid [Wz.] Casella). Einen Tag vor der Clearance und am Clearance-Tag je 4 g peroral.

c) 4,5-Dijod-4-pyridon-N-essigsaures Diäthanolamin (Diodone [Wz.] Guerbet). Mit der Inulin-Schnellinfusion wurden etwa 1 ml/min, mit der Inulin-Sulfonamid-Dauertropfinfusion etwa 0,7 ml/min als 50%ige Lösung gegeben. Alle 3 Verbindungen geben weder in wäßriger Lösung noch im Serum nach Verabreichung eine positive Sulfonamidreaktion.

2. Bestimmung der Eliminationskonstanten k_2 und $k_2{}^+$ in derselben Weise, wie wir dies schon früher mitteilten (Portwich u. Büttner). Bei unseren jetzigen Versuchen wurden 2 Tage vor i.v. Gaben von 3 g 4-Sulfadimethylpyrimidin und während der Versuchsdauer täglich je 3 g p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid peroral genommen.

3. Statistische Berechnung. Die Feststellung signifikanter Unterschiede erfolgte mit Hilfe der t-Verteilung (R. A. Fisher) unter Benutzung von Koller. In den Tabellen bedeutet $\sigma = \pm \sqrt{\frac{v^2}{n-1}}$ die Standardabweichung.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Clearance-Versuche bei Hemmung der Tubulusfunktion sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Die bei diesen Versuchen gefundenen Mittelwerte der Cl. R. wurden mit den seinerzeit erhaltenen Normalwerten statistisch verglichen (siehe Tab. 2). Dabei ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der normalen Cl. R. und der Cl. R. unter Hemmung der Tubulusfunktion sowohl für freies als auch für acetyliertes 4-Sulfadimethylpyrimidin. Zur weiteren Sicherung

[1] Diese Bezeichnung ist identisch mit 6-Sulfanilamido-2,4-dimethyl-pyrimidin. Warenzeichen: „Aristamid" Nordmark Werke; „Elkosin" Ciba A.G.

Tabelle 1. *Clearances von freiem und acetyliertem 4-Sulfadimethylpyrimidin unter Hemmung der Tubulusfunktion*

Nr.	Serumgehalt an 4-Sulfadimethylpyrimidin		Urin (ml/min)	Clearance (ml/min)			Clearance-Ratio 4-Sulfadimethylp.	
	frei (mg/ml)	acet. (mg/ml)		Inulin	4-Sulfadimethylp.		frei	acet.
					frei	acet.		
I. Nach Verabreichung von 4,5-Dijod-4-pyridon-N-essigsaurem Diäthanolamin								
13/1	0,179	0,0108	6,7	92,7	14,7	3,6	0,16	0,04
13/2	0,177	0,0123	4,3	80,1	11,6	10,8	0,14	0,13
13/3	0,177	0,0140	3,5	72,6	12,1	4,9	0,17	0,07
14/1	0,158	0,0158	3,2	111,1	15,1	3,3	0,14	0,03
14/2	0,158	0,0183	3,8	90,6	15,4	4,6	0,17	0,05
15/3	0,146	0,0098	3,7	96,6	19,6	4,9	0,20	0,05
15/4	0,146	0,0125	5,7	86,1	17,8	6,9	0,21	0,08
15/5	0,150	0,0145	6,5	89,4	20,5	4,1	0,23	0,05
16/1	0,141	0,0090	2,4	67,8	10,0	7,4	0,15	0,11
16/2	0,139	0,0115	2,7	67,6	10,0	3,3	0,15	0,05
16/3	0,139	0,0133	2,6	52,0	9,3	4,1	0,18	0,08
II. Nach Verabreichung von p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid								
2/1	0,141	0,0095	5,0	80,4	15,0	8,4	0,19	0,10
2/2	0,138	0,0122	4,3	85,2	14,6	7,4	0,17	0,09
2/3	0,139	0,0148	2,7	78,3	14,0	7,4	0,14	0,09
4/1	0,157	0,0080	8,0	116,2	18,5	2,7	0,16	0,02
4/2	0,157	0,0980	3,2	86,6	16,8	10,6	0,19	0,12
4/3	0,158	0,0117	2,5	96,0	16,6	9,7	0,18	0,10
8/1	0,138	0,0075	2,4	90,7	16,4	2,2	0,18	0,02
8/2	0,135	0,0100	1,9	105,2	19,3	11,5	0,18	0,11
8/3	0,134	0,0125	2,4	119,4	23,8	5,4	0,19	0,05
9/1	0,135	0,0075	2,8	77,0	18,7	2,5	0,24	0,03
9/2	0,136	0,0095	1,9	106,1	20,9	3,1	0,19	0,03
9/3	0,142	0,0125	1,5	107,4	22,0	4,9	0,20	0,05
10/1	0,140	0,0070	1,0	86,5	20,9	1,4	0,24	0,02
10/2	0,141	0,0090	1,2	95,9	24,5	8,6	0,25	0,09
10/3	0,145	0,0110	1,2	108,6	24,6	17,3	0,23	0,16
11/1	0,140	0,0167	3,5	57,4	12,9	1,3	0,22	0,02
11/2	0,139	0,0192	3,1	58,8	14,4	6,4	0,24	0,11
11/3	0,144	0,0222	2,9	60,5	15,5	5,2	0,26	0,09
12/1	0,156	0,0118	2,2	82,9	15,3	6,8	0,18	0,08
12/2	0,160	0,0138	1,5	75,9	14,3	5,4	0,19	0,07
12/3	0,160	0,0148	1,5	73,9	15,3	9,9	0,21	0,13
24/1	0,149	0,0090	1,2	80,0	20,1	5,8	0,25	0,07
24/2	0,145	0,0115	1,4	80,0	18,8	6,2	0,24	0,08
24/3	0,142	0,0128	1,8	88,3	21,5	11,1	0,24	0,13
26/1	0,153	0,0050	5,3	83,9	20,3	3,2	0,24	0,04
26/2	0,154	0,0070	2,6	70,0	17,3	2,6	0,25	0,04
26/3	0,154	0,0100	3,1	78,9	20,2	2,0	0,25	0,03
III. Nach Verabreichung von p-Carboxy-benzolsulfo-diäthylamid								
7/1	0,141	0,0065	2,4	108,1	22,3	2,6	0,20	0,02
7/2	0,137	0,0083	2,2	131,5	22,3	3,9	0,17	0,03
7/3	0,136	0,0110	1,6	152,2	20,0	2,4	0,13	0,02

führten wir an einer Versuchsperson zunächst 2 Clearance-Perioden ohne Hemmung der tubulären Funktion durch und verfolgten dann nach i.v. Gabe von 4,5-Dijod-4-pyridon-N-essigsaurem Diäthanolamin weitere

Tabelle 2. *Mittelwerte und statistischer Vergleich der Clearance-Ergebnisse*

Clearance-Ratio				Anzahl der Versuche n	excretion ratio des freien Sulfadimethylpyrimidins	Statistischer Vergleich mit den normalen Cl. R.-Werten		
freies Sulfadimethylpyrimidin		acet. Sulfadimethylpyrimidin				$t_{g\text{-}f}$		Zufallshöchstwert von t
Mittel	σ	Mittel	σ			frei	ac.	
				I. Normal				
0,35	0,08	0,28	0,14	34	1,03			
				II. Nach 4,5-Dijod-4-pyridon-N-essigsaurem Diäthanolamin				
0,17	0,03	0,07	0,03	12	0,50	7,6	5,1	3,15
				III. Nach p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid				
0,21	0,03	0,07	0,04	27	0,62	8,6	7,5	3,15
				IV. Nach p-Carboxy-benzolsulfo-diäthylamid				
0,17		0,02		3				

Tabelle 3. *Beeinflussung der Clearance-Ratio von 4-Sulfadimethylpyrimidin und Sulfamerazin durch Infusion von 4,5-Dijod-4-pyridon-N-essigsaurem Diäthanolamin*

Zeit (min)	Serumkonzentration an Sulfonamid (mg-%)		Clearance-Ratio des Sulfonamids		
	frei	acetyl.	frei	acetyl.	
			I. 4-Sulfadimethylpyrimidin		
0	16,0	0,6			Sulfonamid-Infusion
			0,35	0,44	
40	14,9	0,8			
			0,33	0,32	
80	14,9	0,9			Beginn der Infusion des 4,5-Dijod-4-pyridon-Derivates (Einzelheiten siehe unter Methodik). Weiterlaufen der Sulfonamidinfusion
			0,20	0,05	
120	14,4	1,1			
			0,21	0,08	
160	14,8	1,4			
			0,23	0,05	
200	15,3	1,5			Ende des Versuchs
			II. Sulfamerazin		
0	10,5	1,1			Sulfonamid-Infusion
			0,07	0,82	
40	11,3	1,1			
			0,07	0,99	
80	11,9	1,1			Beginn der Infusion des 4,5-Dijod-4-pyridon-Derivates. Weiterlaufen der Sulfonamidinfusion
			0,06	0,37	
120	11,3	1,4			
			0,07	0,26	
160	11,4	2,0			Ende des Versuchs

3 Clearance-Perioden. Wie Tab. 3 zeigt, ist eine eindeutige Senkung der Cl. R. als Ausdruck der Tubulushemmung zu beobachten. Im Parallelversuch mit Sulfamerazin erhielten wir in Übereinstimmung mit Earle sowie Reinhold u. Mitarb. einen entsprechenden Effekt nur beim Acetyl-Sulfamerazin. Wenn die Ausscheidung dieser Verbindungen gehemmt ist,

Tabelle 4. *Eliminationskonstanten des freien 4-Sulfadimethylpyrimidins (k_2) und des gesamten 4-Sulfadimethylpyrimidins (k_2^+) mit und ohne Hemmung der Tubulusfunktion durch p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid*

k_2 (Std^{-1})	σ	n	k_2^+ (Std^{-1})	σ	n	Statistischer Vergleich der Eliminationskonstanten mit und ohne Tubulushemmung		
						t_{ges} k_2	t_{ges} k_2^+	Zufallshöchstwert von t
I. Nach Verabreichung von p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid								
0,051	0,003	4	0,038	0,001	3	7,5	5,0	4,9
II. Ohne Tubulushemmung								
0,79	0,007	5	0,064	0,009	5			

muß ein langsamerer Abfall der Serumkonzentration resultieren. Tatsächlich sind die Eliminationskonstanten k_2 und k_2^+ für freies bzw. gesamtes 4-Sulfadimethylpyrimidin statistisch signifikant gegenüber den Normalwerten erniedrigt (siehe Tab. 4). Ein weiterer Beweis für eine Tubulus-Sekretion der Sulfonamide wäre der Nachweis einer sogenannten „clearance-selfdepression". Leider lassen sich wegen der Toxicität entsprechend hohe Serumkonzentrationen während der Dauer eines Clearance-Versuches nicht erreichen.

Besprechung

1. Die „excretion ratio" beim 4-Sulfadimethylpyrimidin. Für die Berechnung der E. R. der freien und acetylierten Verbindung ist die Kenntnis des nicht eiweißgebundenen, ultrafiltrablen Anteils dieser Substanzen notwendig. Der ultrafiltrable Anteil kann zwar experimentell durch Dialyse oder Ultrafiltration bestimmt werden, doch kann man selbst bei Beachtung der bei der Glomerulusfiltration maßgeblichen Faktoren nur mit Annäherungswerten rechnen, so daß Schlüsse nur begrenzt möglich sind. Über den ultrafiltrablen Anteil des freien 4-Sulfadimethylpyrimidins liegen Untersuchungsergebnisse von Witzgall vor, der einen ungebundenen Anteil im menschlichen Plasma von 34% (bei 10 mg-% Plasmakonzentration und 21 bis 22° C) fand. Die Untersuchungen erfolgten durch Ultrafiltration mit $2^1/_2$ bis 4 Atü. Mit diesem Wert wurde die in Tab. 2 angegebene E. R. berechnet nach der Gleichung

$$\text{E. R.} = \frac{\text{Clearance-Ratio}}{\text{ultrafiltrabler Anteil des Sulfonamids (in Bruchteilen von 1)}}.$$

Werte für acetyliertes 4-Sulfadimethylpyrimidin liegen nicht vor, die bisherigen Untersuchungen bei anderen Sulfonamiden zeigen aber, daß der eiweißgebundene Anteil bei N_4-substituierten Acetylderivaten ungefähr dem der freien Verbindung entspricht. Die so erhaltene E. R., um 1 liegend, scheint für einen reinen Filtrationsvorgang bei der Ausscheidung unseres Präparates zu sprechen.

2. Die Hemmung der Tubulusfunktion bei der Ausscheidung des 4-Sulfadimethylpyrimidins. Aus unseren in den Tabellen niedergelegten Ergebnissen folgt, daß bei gleichzeitiger Verabreichung von 4,5-Dijod-4-pyridon-N-essigsaurem Diäthanolamin und 4-Sulfadimethylpyrimidin die Ausscheidung der freien und in noch ausgeprägterem Maße die Ausscheidung der acetylierten Verbindung herabgesetzt wird.

Aus dem Schrifttum geht hervor, daß die Ausscheidungshemmung tubulär sezernierter Substanzen durch obiges Präparat und verwandte jodhaltige Röntgenkontrastmittel bekannt ist. Dieser Effekt wird als Massenwirkung, das heißt kompetitive Hemmung bei der Konkurrenz um den Tubulusapparat aufgefaßt. Lundquist gelang es, die Ausscheidung von Sulfathiazol und Sulfamethylthiodiazol durch o-Jodhippursäure zu hemmen.

In etwa gleichem Maße konnten wir die Ausscheidung von freiem und acetyliertem 4-Sulfadimethylpyrimidin durch p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid und p-Carboxy-benzolsulfo-diäthylamid beeinträchtigen. Diese Stoffe haben bekanntlich eine so ausgesprochene Hemmwirkung auf die Ausscheidung des Penicillins, daß man auf einen spezifischen Wirkungsmechanismus geschlossen hat. Daneben werden eine Anzahl anderer Stoffe, von denen zum Teil eine Sekretion bekannt ist, wie Phenolrot, p-Aminohippursäure, p-Aminosalicylsäure, Salicylsäure, Pantothensäure und Jodröntgenkontrastmittel, ebenfalls in ihrer Ausscheidung kompetitiv gehemmt (Beyer). Eine abschließende Aufklärung des Wirkungsmechanismus dieser Hemmstoffe steht allerdings noch aus. Beyer u. Mitarb., die beim Hund den Effekt gleichzeitiger Verabreichung von p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid und Sulfathiazol untersuchten, fanden keine signifikante Abnahme der Cl. R.

Als Folge einer Ausscheidungshemmung tritt, wie Crosley u. Mitarb. nach Verabreichung von Triple-Sulfa und p-Carboxy-benzolsulfo-di-n-propylamid gezeigt haben, ein langsamerer Abfall der Serumkonzentration des Sulfonamids ein. Dieser Effekt läßt sich noch exakter durch Bestimmung der Eliminationskonstanten k_2 beweisen (siehe Tab. 4).

Unsere Versuche zeigen, daß bei der Ausscheidung von freiem und acetyliertem 4-Sulfadimethylpyrimidin die Tubuli aktiv beteiligt sind. Die E. R. von etwa 1 kann darum nur durch die Annahme eines „Drei-Komponenten-Systems" erklärt werden. Auffallend ist, daß bei vielen N_1-heterocyclisch substituierten Sulfonamiden aktive Tubulusprozesse

beobachtet worden sind, und daß gerade bei diesen Verbindungen eine hohe Eiweißbindung festzustellen ist.

Für ihre Hilfe danken wir Fräulein M. v. Graffen. Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Nordmark Werke Ütersen durchgeführt.

Zusammenfassung

Durch verschiedene Substanzen, deren Wirkung auf den Tubulusapparat bekannt ist, konnte die Ausscheidung des freien und acetylierten 4-Sulfadimethylpyrimidins eindeutig gehemmt werden. Als Ausscheidungsmechanismus wird ein Drei-Komponenten-System angenommen.

Literatur

Barclay, J. A., W. T. Cooke and R. A. Kenney: Evidence for a three-component-system of renal excretion. Acta med. scand. (Stockh.) **128**, 500 (1947). — Beyer, K. H.: Factors basic to the development of useful inhibitors of renal transport mechanisms. Arch. internat. Pharmacodynamie. **98**, 97 (1954). — Beyer, K. H., H. F. Russo, E. K. Tillson, A. K. Miller, W. F. Verwey and S. R. Gass: Benemid, its renal affinity and its elimination. Amer. J. Physiol. **166**, 625 (1951). — Crosley, A. P., G. M. Bayne, S. C. Carfagno and W. P. Boger: Effects of p-(di-n-propylsulfamyl)benzoic acid (Benemid) on free and total sulfonamide plasma levels. J. Labor. a. Clin. Med. **40**. 730 (1952). — Earle, D. P.: Renal excretion of sulfamerazine. J. Clin. Invest. **23**, 914 (1944). — Koller, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. 3. Aufl. Darmstadt 1953. — Krebs, K. G., u. H. Franke: Zur Bestimmung der „Sulfonamide" (Prontosil, Uliron, Albucid u. ä.). Klin. Wschr. **1939**, 1248. — Lindahl, O., and B. Josephson: The kidney function and the renal clearances of some sulfanilamide derivates. Acta med. scand. (Stockh.) **120**, 195 (1945). — Lundquist, F.: Renal tubular secretion of sulfonamides and p-aminobenzoic acid. Acta pharmacol. (Copenh.) **1**, 307 (1945). — Portwich, F., H. Büttner u. J. Paulini: Über die Ausscheidung des 6-Sulfanilamido-2,4-dimethyl-pyrimidins und seines Acetylderivates durch die gesunde menschliche Niere. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 123 (1955). — Portwich, F., u. H. Büttner: Sulfonamidkonzentrationen im Serum nach Verabreichung kombinierter Sulfonamide. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 75 (1956). — Reinhold, J. G., H. F. Flippin, A. H. Domm, J. J. Zimmermann and L. Schwartz: Renal clearance of sulfamerazine, sulfadiazine, sulfathiazole, and sulfapyridine in man. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **83**, 279 (1945). — Witzgall, H.: Die Verteilung von körperfremden Stoffen im Blut und ihr Einfluß auf die Pharmakodynamik. Habilitationsschrift. Berlin 1951.

Dr. F. Portwich, Kiel, Medizinische Universitätsklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 520—535 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Respiratorische Arrhythmie und respiratorische Blutdruckschwankung beim wachen Hund

Von
E. Gerstenberg, U. Wagenmann, E. Schmid und R. Taugner

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. Juli 1956)

Dem feineren Mechanismus von respiratorischer Arrhythmie und atmungsabhängiger Blutdruckschwankung sind zahlreiche, in ihren Ergebnissen z. T. weit voneinander abweichende Arbeiten gewidmet worden. Ursache vieler Unsicherheiten ist die komplizierte funktionelle Verknüpfung von Atmung und Kreislauf, die sich der schonenden Isolierung von Teilvorgängen widersetzt. Es sind daher wohl die wesentlichen Bindeglieder zwischen Atmungsvorgang und Kreislaufgeschehen bekannt; der genaue Anteil einzelner Faktoren an den jeweiligen atmungsabhängigen Kreislaufreaktionen ist jedoch weiterhin strittig.

Die respiratorische Arrhythmie soll hauptsächlich durch verschiedene Füllung des rechten Vorhofs infolge respiratorischer Schwankungen des Thoraxinnendrucks bedingt sein (Bainbridge-Reflex), aber auch über die Pressoreceptoren sowie — durch zentrale oder reflektorische Koppelung — über das Atmungszentrum zustande kommen können. Als Ursache der respiratorischen Blutdruckschwankungen werden vor allem atemmechanisch bedingte Veränderungen des Schlagvolumens angesehen.

Schroeder hat neuerdings auf Grund von Einzelpulsanalysen nach Wezler u. Böger an nichtnarkotisierten Hunden sowie am Menschen die Meinung vertreten, daß die Bedeutung gewisser atemsynchroner Variationen des peripheren Gefäßwiderstandes bisher nicht gebührend berücksichtigt worden sei. Nach Schroeder u. Brehm wird z. B. die Herzfrequenz in Abhängigkeit vom Atemcyclus zwar tatsächlich durch den Bainbridge-Reflex gesteuert. Die inspiratorische Vermehrung des venösen Rückstroms soll im Gegensatz zur bisherigen Auffassung aber nicht atemmechanisch bedingt sein, sonden durch eine Abnahme des gesamten peripheren Widerstandes während der Einatmung zustande kommen.

Auch die respiratorischen Schwankungen des arteriellen Drucks sind nach Schroeder u. Losse nicht nur, wie bisher vermutet, durch atemmechanisch bedingte Schwankungen des Schlagvolumens verursacht. Sie

seien außerdem — jedoch nicht ausschließlich wie die respiratorische Arrhythmie — in entscheidender Weise von den atemsynchronen Schwankungen des peripheren Gefäßwiderstandes, schließlich auch noch von entsprechenden Variationen des Elastizitätskoeffizienten abhängig. Die an der Entstehung von respiratorischer Arrhythmie und atmungsabhängiger Blutdruckschwankung beteiligten Widerstandsänderungen sollen nach Schroeder u. Mitarb. durch Irradiation der respiratorischen Erregung auf das Vasomotorenzentrum entstehen.

Diese Darstellung weicht in wesentlichen Punkten von der bisherigen Auffassung ab; sie blieb auch nicht unwidersprochen [vgl. Bauereisen (2)]. Da uns in Form von Kontrollwerten aus pharmakologischen Versuchen ein recht vielfältiges, in dieser Hinsicht noch nicht ausgewertetes Material zur Verfügung stand, schien es angebracht, den wichtigsten Befunden von Schroeder mit gleicher Methodik nachzugehen. Dabei ergaben sich einige, wie uns scheint, nicht unwesentliche Abweichungen, die zur Mitteilung der dabei gewonnenen Erfahrungen auffordern.

Methodik

Die Versuche wurden an nichtnarkotisierten Carotisschlingenhunden im Gewicht von 17—28 kg mit den Methoden von Schroeder (1, 2) durchgeführt. Die von Schroeder u. Brehm vorgenommene periphere Abklemmung der Carotis zur seitenständigen Messung des Aortendrucks kam in einigen Versuchen kontrollweise zur Anwendung. Die Ergebnisse waren dabei im Prinzip die gleichen. An den optisch aufgezeichneten Carotis- und Femoralispulskurven wurden für jeden Puls Schlagvolumen (V_s), peripherer (W_2) und elastischer Widerstand (E') nach Wezler u. Böger berechnet. Wir korrigierten dabei die Dauer der einzelnen Pulse für die Berechnung von W_2 im Hinblick auf stationäre Kreislaufverhältnisse in der von Schroeder u. Brehm angegebenen Weise. Die Atmung wurde mittels Thoraxmanschette ebenfalls optisch registriert.

Die übersichtliche graphische Darstellung bzw. zusammenfassende Beschreibung der respiratorischen Veränderungen einzelner Kreislaufgrößen ist bei derartigen Untersuchungen kaum ohne eine gewisse Willkür möglich. In unseren Abbildungen wurden die systolischen und diastolischen Druckwerte zusammen mit den anderen gemessenen bzw. errechneten Kreislaufgrößen zeitlich in die Mitte der einzelnen Pulse verlegt. Hinsichtlich der Blutdruckwerte wird eine solche Darstellung selbstverständlich nur dem Verhalten des für die einzelnen Pulse gültigen Mitteldrucks gerecht, während die systolischen und diastolischen Drucke jeweils kurz nach Beginn bzw. am Ende der einzelnen Pulsintervalle zu denken sind. Derartige, kaum zu vermeidende Ungenauigkeiten fallen naturgemäß bei langsamer Herzfrequenz und besonders dann stärker ins Gewicht, wenn auf einen Atemzug, wie z. B. in Abb. 3, nur 4—5 Pulse fallen. Es ist weiterhin zu beachten, daß für die Aufzeichnung der Herzfrequenz der reziproke Wert der wahren Pulsdauer τ, für die Berechnung von W_2 dagegen der nach Schroeder u. Brehm korrigierte Wert τ_2 verwendet wurde.

In Abb. 4 sind die atemrhythmischen Veränderungen der wichtigsten Kreislaufgrößen aller Tiere eingetragen. Es handelt sich dabei um halbschematische Kurvenbilder, die durch Übereinanderzeichnen der Werte aus 2 –3 Atemcyclen gewonnen wurden. Diese Abbildung soll vor allem die zeitlichen Zusammenhänge zwischen Kreislaufreaktion und Atemcyclus illustrieren. Es wurde daher jeweils nur der

Maßstab der Ordinaten ohne Ausgangswerte angegeben. Auf der Abszisse findet sich als gemeinsamer Bezugspunkt der Umschlag von der Inspiration zur Exspiration. Links davon sind die Veränderungen der betreffenden Kreislaufgrößen während der Inspiration, rechts während der Exspiration aufgetragen. Die Kurven sind nach der Atemfrequenz geordnet.

Versuchsergebnisse

Wir werteten nur solche Versuche aus, bei denen sich die Veränderungen der verschiedenen Kreislaufgrößen in den einzelnen Atemzügen durch besondere Gleichförmigkeit auszeichneten. Hierdurch sollte der Einfluß von Blutdruckwellen dritter Ordnung, die bei unseren Tieren wiederholt zu beobachten waren, nach Möglichkeit ausgeschaltet werden. In seltenen Fällen wichen dennoch die Reaktionen einzelner Kreislaufgrößen von Atemzug zu Atemzug so stark voneinander ab, daß in Abb. 4 keine Kurven eingezeichnet werden konnten (eingeklammerte Ziffern). Es ist möglich, daß diese Ausnahmen auf Interferenzen zwischen schwachen Wellen dritter Ordnung und den Atemschwankungen beruhen.

Es wurden insgesamt 17 Einzelpulsanalysen an 10 verschiedenen Tieren vorgenommen*. Die Atemfrequenz schwankte dabei zwischen 9 und 19 Atemzügen/min. Die Ausgangslage der Herzfrequenz, beurteilt nach dem Zustand am Ende der Exspiration**, lag zwischen 30 und 120 Schlägen/min, wobei die niedrigen Werte durchweg bei langsamer Atmung vorkamen (vgl. Abb. 3). Diese Unterschiede sind für die zeitlichen Beziehungen der beobachteten Kreislaufreaktionen zum Atemcyclus von Bedeutung. Wir teilten das Versuchsmaterial daher willkürlich je nach der Atemfrequenz in 3 Gruppen von 9—12, 13—16 und 17—19 Atemzügen/min ein.

Die starken individuellen Unterschiede in Atem- und Herzfrequenz sind mit Sicherheit nicht auf psychische Faktoren wie etwa mangelndes Training einzelner Tiere zurückzuführen. Sie hängen auch nicht mit der Größe der Tiere zusammen. Es handelt sich um recht konstante, zum Teil wohl altersbedingte Unterschiede, die wahrscheinlich Ausdruck einer bestimmten Stoffwechsellage bzw. eines charakteristischen vegetativen Tonus sind.

Die atemabhängigen Veränderungen der einzelnen Kreislaufgrößen sollen im folgenden zunächst ohne Vergleich mit den Ergebnissen anderer Untersucher dargestellt werden.

Die respiratorischen Schwankungen des Mitteldrucks waren bei langsamer Atemfrequenz (9—12/min) besonders deutlich (Abb. 3). Sie wiesen hier innerhalb der einzelnen Atemphasen einen „biphasischen“*** Gang auf: Der Anstieg des Mitteldrucks erstreckte sich in dieser Gruppe etwa

---

* Den Herren Dr. Hotovy und Dr. Rösch von der Fa. E. Merck-Darmstadt danken wir auch auf diesem Wege für die Überlassung von unausgewertetem Versuchsmaterial.

** Unter „Exspiration“ werden im folgenden Ausatmungsbewegung und respiratorische Pause zusammen verstanden.

*** Als „biphasisch“ werden im folgenden atmungsabhängige Kreislaufveränderungen bezeichnet, deren Richtung sich innerhalb einer Atemphase (Inspiration bzw. Exspiration) umkehrt.

von der Mitte der Inspiration bis gegen Mitte der Exspiration, der Abfall des Mitteldrucks von hier bis etwa zur Mitte der Inspiration.

Bei hoher Atemfrequenz (16—19/min) waren die respiratorischen Schwankungen des Mitteldrucks geringer. Der Druck fiel in der Inspiration gelegentlich monophasisch ab. Während der Exspiration war der Druckanstieg aber auch in diesen Fällen von einem Mitteldruckabfall gefolgt (Abb. 1).

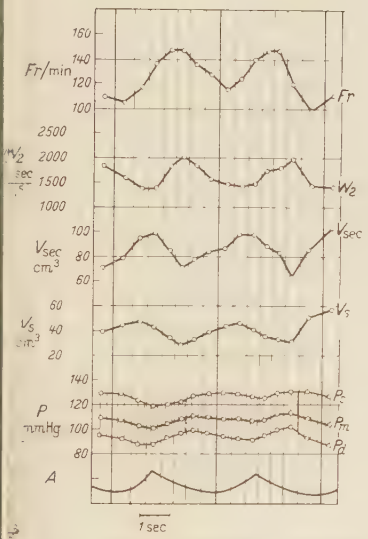


Abb. 1. Einzelpulsanalyse nach Wezler u. Böger, modifiziert nach Schroeder. Hund Struppi, 24 kg. Die dünnen senkrechten Linien begrenzen die einzelnen Pulsintervalle. *Fr* Herzfrequenz; W_2 peripherer Gefäßwiderstand; V_{sec} Sekundenvolumen; V_s Schlagvolumen; *P* Carotisdruck; P_s systolischer, P_d diastolischer, P_m Mitteldruck

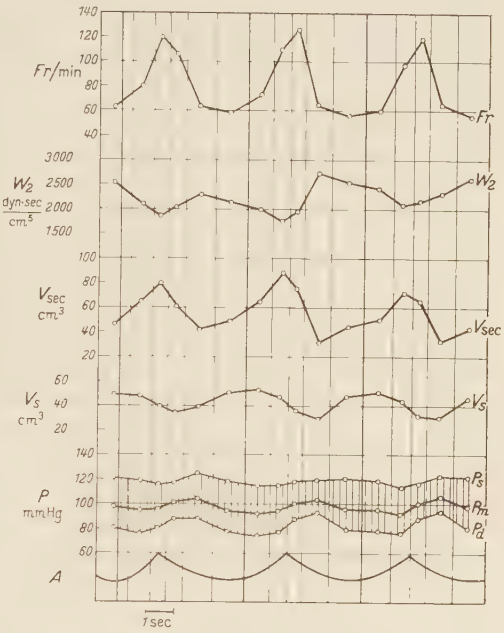


Abb. 2. Einzelpulsanalyse nach Wezler u. Böger, modifiziert nach Schroeder. Hund Blondie, 21 kg. Die dünnen senkrechten Linien begrenzen die einzelnen Pulsintervalle. *Fr* Herzfrequenz; W_2 peripherer Gefäßwiderstand; V_{sec} Sekundenvolumen; V_s Schlagvolumen; *P* Carotisdruck; P_s systolischer, P_d diastolischer, P_m Mitteldruck

Bei mittlerer Atemfrequenz verliefen die Änderungen des Mitteldrucks — ähnlich wie bei langsamer Atmung — fast ausnahmslos biphasisch (Abb. 2).

Die respiratorischen Schwankungen des diastolischen Drucks waren im allgemeinen stärker als die des systolischen (Abb. 1—3). Sie gingen außerdem den systolischen Druckschwankungen — vor allem bei mittlerer Atemfrequenz — meist um 1—2 Pulse voraus.

Aus diesem Verhalten des systolischen und diastolischen Drucks resultierten meist inspiratorische Abnahmen und exspiratorische Zunahmen der *Blutdruckamplitude*. Das Maximum der Amplitude fiel dabei in den

meisten Versuchen mit dem Beginn der Inspiration zusammen. Das Minimum trat in 2 Fällen zu Beginn der Exspiration, in 12 weiteren kurz danach auf. Lediglich bei einer Ausnahme fiel das Minimum der Druckamplitude erst mit der Mitte der Exspiration zusammen. Bei 2 Hunden traten keine deutlichen Amplitudenänderungen auf.

Die *respiratorische Arrhythmie* betrug 30—230% des exspiratorischen Ruhewerts. Die starken Frequenzanstiege fanden sich ausnahmslos bei

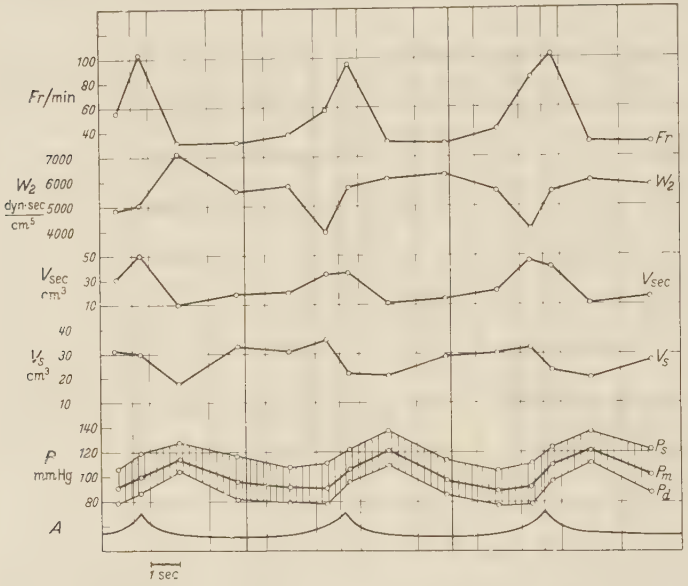


Abb. 3. Einzelpulsanalyse nach Wezler u. Böger, modifiziert nach Schroeder. Hund Negus, 17,5 kg. Die dünnen senkrechten Linien begrenzen die einzelnen Pulsintervalle. *Fr* Herzfrequenz; W_2 peripherer Gefäßwiderstand; V_{sec} Sekundenvolumen; V_s Schlagvolumen; *P* Carotisdruck; P_s systolischer, P_d diastolischer, P_m Mitteldruck

Tieren mit niedriger, die geringen respiratorischen Arrhythmien bei solchen mit hoher Ausgangsfrequenz. Mit langsamer Atmung waren daher meist deutliche, mit rascher Atmung nur geringgradige respiratorische Arrhythmien verknüpft (Abb. 1—3).

Die Veränderungen der Herzfrequenz verliefen im Gegensatz zu denen des Blutdrucks im wesentlichen synchron mit den Atemphasen: Die Herzfrequenz wurde inspiratorisch beschleunigt und exspiratorisch verlangsamt. Während der Inspiration stieg die Schlagfolge sogar ausnahmslos fortlaufend an. Beginn und Ende des Frequenzanstiegs lagen jedoch z. T. in der Exspirationsphase. So war das Maximum der Tachykardie in 8 von 15 Versuchen um 0,5—1 sec in die Exspirationsphase hinein verschoben (Abb. 4a). Die Beschleunigung der Herzfrequenz begann andererseits in 14 von 17 Versuchen tatsächlich mit der Inspiration. In

drei Fällen stieg die Frequenz jedoch schon 1—1,5 sec vor Inspirationsbeginn deutlich wieder an.

Das *Schlagvolumen* nahm — wie die Blutdruckamplitude — im wesentlichen inspiratorisch ab und exspiratorisch zu (Abb. 1—3). Es stieg aber mit dem Beginn der Inspiration häufig noch etwas an, um erst in deren beiden letzten Dritteln wieder abzufallen (biphasischer Verlauf; vgl. Abb. 4c). Das Maximum des Schlagvolumens fiel dementsprechend nur in 7 von 15 Versuchen mit dem Wechsel von Exspiration zu Inspiration zusammen und lag sonst meist zwischen dem 1. und 2. Drittel der Inspiration. Die geringsten Schlagvolumina traten daher meist erst im 1. oder gar 2. Drittel der Exspiration auf. Im Gegensatz zur respiratorischen Arrhythmie war kein Einfluß der Atemfrequenz auf die Größe der respiratorischen Schlagvolumänderungen zu beobachten (Abb. 4c). Sie betrugen, auf das jeweilige Minimum bezogen, 40—110%.

Die respiratorischen Schwankungen der Förderleistung können wegen der starken Arrhythmie beim Hund nur an Hand des *Sekundenvolumens* und nicht am Schlagvolumen eindeutig beurteilt werden. Das Sekundenvolumen verlief sogar eher mit der Herzfrequenz als mit dem Schlagvolumen parallel. Ähnlich wie bei der Herzfrequenz — und im Gegensatz zum zweiphasischen Abfall des Schlagvolumens — beobachteten wir auch beim Sekundenvolumen in 8 von 12 verwertbaren Versuchen einphasische inspiratorische Anstiege. Das Sekundenvolumen fiel schließlich, im Gegensatz zum Schlagvolumen, exspiratorisch ab, wobei allerdings ein deutlich zweiphasischer Verlauf mit sekundärem exspiratorischem Wiederanstieg zu erkennen war (Abb. 1—3, 4d). Bei mittlerer und langsamer Atemfrequenz begann der Abfall des Sekundenvolumens — im Gegensatz zur Herzfrequenz, die hier sogar noch kurz nach Exspirationsbeginn ansteigen konnte — öfters schon kurz vor dem Ende der Inspiration (Abb. 4d).

Auch der gesamte *periphere Gefäßwiderstand* W_2 wies atemrhythmische Veränderungen auf (Abb. 1—3, 4b). Diese Widerstandsänderungen zeigten jedoch keine deutliche Abhängigkeit von der Atemfrequenz und waren — zum Unterschied von den bisher besprochenen Größen — in ihrem Ausmaß besonders variabel (Abb. 4b). Im allgemeinen ließ sich jedoch während der Inspiration ein zweiphasischer Widerstandsabfall, während der Exspiration ein zweiphasischer Anstieg erkennen. Die Veränderungen betrugen (berechnet als Abweichungen vom Minimum) 24 bis 110% mit Ausnahme von 4 Versuchen, wo sie unbedeutend waren.

Auch am *Elastizitätskoeffizienten E'* ließen sich meist atemsynchrone Schwankungen zwischen 10 und 50% ablesen. Maximum und Minimum lagen hier etwa in der Mitte von Exspiration bzw. Inspiration.

In seltenen Fällen waren Atem- und Herzfrequenz der gleichen Tiere bei wiederholter Untersuchung deutlich verschieden (z. B. Abb. 4, Kurven 4 und 15). Dieser Umstand erlaubt die Beantwortung der Frage,

ob die atemsynchronen Kreislaufveränderungen für einzelne Versuchstiere typisch oder im wesentlichen von Herz- und Atemfrequenz abhängig sind. Die hierher gehörigen Beobachtungen bestätigen das aus dem Überblick aller Versuche gewonnene Urteil, daß nämlich Art und

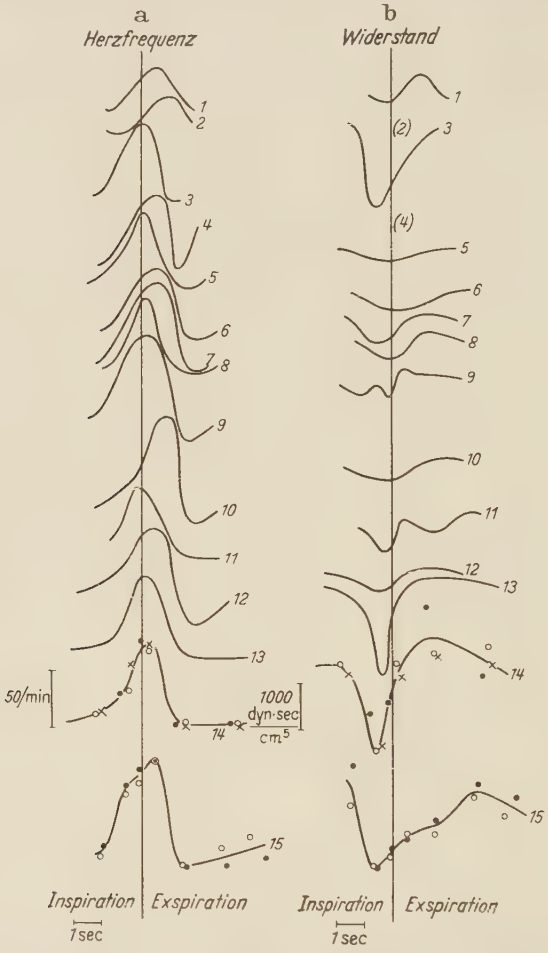
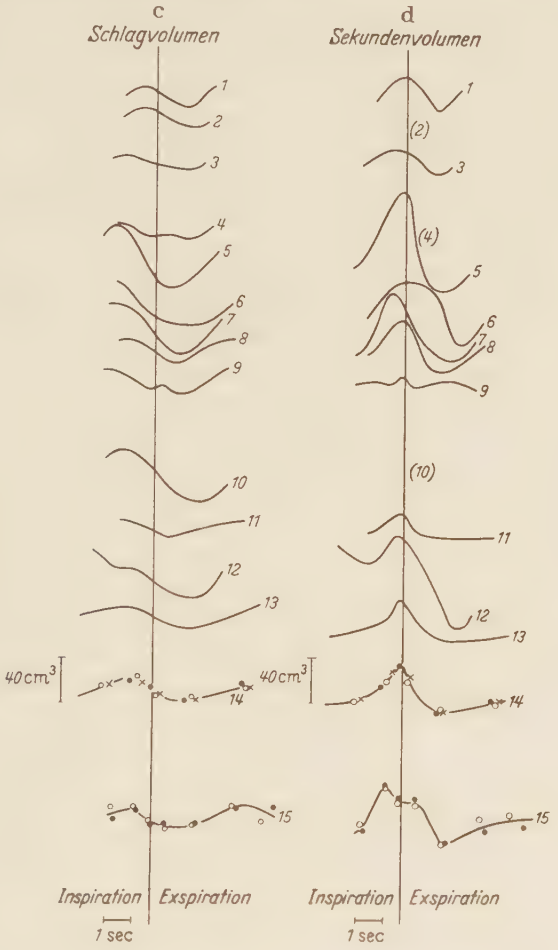


Abb. 4. Graphische Aufzeichnung des Verhaltens der wichtigsten Kreislaufgrößen während des Atemcyclus. Anordnung der Hunde in jeder Kolonne von oben nach unten entsprechend der abnehmenden Atemfrequenz. Kurven mit derselben Ziffer gehören zum gleichen Tier. Die Kurvenpaare 1 u. 2, 4 u. 15, 6 u. 7, 9 u. 11, 10 u. 12, 13 u. 14 stammen jeweils von gleichen Tieren bei verschiedener Atemfrequenz. An den Beispielen 14 und 15 wird gezeigt, wie die Kurven durch Übereinanderzeichnen der Meßpunkte aus 3 bzw. 2 Atemcyclen gewonnen wurden. Bei den eingeklammerten Ziffern fehlt die entsprechende Kurve wegen zu großer Streuung der Meßpunkte. Weitere Erläuterungen s. Methodik

Ausmaß der atemabhängigen Kreislaufreaktionen vor allem von der Herz- und Atemfrequenz abhängen und individuelle Besonderheiten wenig hervortreten.

Diskussion der Versuchsergebnisse

Ein Mangel der vorliegenden Arbeit besteht darin, daß die Blutdruckregistrierung an der Carotisschlinge — über die von Brendel u. Koppermann vorgeschlagene Korrektur hinaus — weiterer Nachprüfung vor allem



mit blutiger Aufzeichnung des arteriellen Drucks bedarf. Die Schroedersche Pelottenmethode (1) dürfte aber — in Verbindung mit den Einzelpulsanalysen nach Wezler u. Böger — zumindest die Richtung der verschiedenen atemsynchronen Kreislaufreaktionen unverfälscht wiedergeben. Es sei daran erinnert, daß die routinemäßige Bearbeitung derartiger Fragen an intakten, nichtnarkotisierten Versuchstieren auf anderem Weg zur Zeit kaum möglich ist.

Diesen Bedenken gegenüber fallen andere Mängel bei der Deutung unserer Ergebnisse weit mehr ins Gewicht. Die hier verwendeten Methoden registrieren ausschließlich die atemabhängigen Reaktionen im arteriellen System. Zum lückenlosen Verständnis ist aber auch die Kenntnis der damit koordinierten Vorgänge auf der venösen Seite des großen Kreislaufs sowie im Lungenkreislauf erforderlich. Es müssen daher Ergebnisse herangezogen werden, die häufig unter durchaus verschiedenen experimentellen Bedingungen, meist in Narkose, z. T. an andersartigen Versuchsobjekten gewonnen wurden.

Zur Erklärung der *respiratorischen Arrhythmie* bieten sich folgende, im Prinzip zwar sichergestellte, in ihrer relativen Bedeutung jedoch schwer abzuschätzende Möglichkeiten: 1. Zentrale Koppelung von Atmungs- und Vaguszentrum (Foà; Heymans u. Mitarb.); 2. reflektorische Koppelung von Atmungs- und Vaguszentrum über die Dehnungsreceptoren der Lunge (vgl. Saalfeld; Heymans u. Mitarb.; Anrep u. Mitarb.); 3. Pressoreceptorenreflex, der schon von Bainbridge je nach der Ausgangsfrequenz als hauptsächliche oder zusätzliche Entstehungsursache der respiratorischen Arrhythmie aufgeführt wurde (vgl. Matthes); 4. Bainbridge-Reflex, der durch vermehrte Vorhofsfüllung a) infolge inspiratorischer Verminderung des intrapulmonalen Drucks, also atemmechanisch zustande kommen sollte, b) nach Schroeder u. Brehm jedoch über atemsynchrone Verminderungen des peripheren Gefäßwiderstandes ausgelöst wird.

Der Depressorreflex kann durch den Vergleich zwischen atemabhängigen Frequenz- und Mitteldruckschwankungen als hauptsächliche Ursache der respiratorischen Arrhythmie des Hundes ausgeschlossen werden. Beginn und Höhepunkt des Frequenzanstiegs waren vom Beginn des Druckabfalls sowie vom Blutdruckminimum fast ohne Ausnahme wesentlich weiter entfernt, als der Latenzzeit des Pressorreflexes entspricht. Das gleiche gilt für den Frequenzabfall, der meist zu Beginn der Exspiration oder 0,5—1 sec später einsetzte, während der Druckanstieg (vor allem bei mittlerer und langsamer Atemfrequenz) oft schon Mitte der Inspiration begann.

Der sonst bei keiner weiteren Kreislaufgröße gefundene weitgehend synchrone Verlauf von Atemphasen und respiratorischer Arrhythmie läßt vor allem an die Deutungsmöglichkeiten 1, 2 und 4a denken. Eine Entscheidung ist am intakten Tier mit den zur Zeit verfügbaren Methoden nicht möglich. Vieles spricht für eine atemmechanische Erklärung über den Bainbridge-Reflex (4a).

Sicher ist, daß durch die inspiratorische Lungendehnung gleichzeitig mit dem intrapulmonalen auch der Druck in den intrathorakalen Venen absinkt. Das gleiche gilt für den absoluten Vorhofsdruck. Dadurch wird das Druckgefälle zwischen extra- und intrathorakalen Venen größer, das venöse Angebot an das rechte Herz nimmt

zu (Grinberg; Brecher u. Mixter; Mixter; A. Müller). Der von Holt und Duomarco beschriebene Venenkollaps behindert diesen vermehrten Zustrom offenbar nur bei unphysiologisch tiefer Einatmung. Die inspiratorische Erhöhung des Blutangebots führt daher zu einer meßbaren Steigerung des effektiven*) Druckes im rechten Vorhof [Eyster u. Hicks; Patras u. Boyd; Opdyke u. Mitarb. (2); MacCanon u. Horvarth; Bjursted u. Hesser].

Aus diesen Befunden geht wohl hervor, daß durch die Inspirationsbewegung als solche, d. h. durch die Atemmechanik, alle Voraussetzungen zur Auslösung eines Bainbridge-Reflexes gegeben sind.

Gewisse, im vorausgehenden beschriebene Ausnahmen können jedoch durch diesen Reflex sowie die Deutungsmöglichkeiten 1 und 2 nicht erklärt werden. Das gilt vor allem für das Einsetzen der Herzbeschleunigung schon vor Beginn der Inspiration.

Es wäre denkbar, daß der exspiratorische Frequenzabfall nicht nur durch das Nachlassen der unter 1, 2 oder 4a aufgeführten Einflüsse erfolgt, sondern außerdem durch den Blutdruckanstieg im ersten Teil der Exspiration verstärkt wird. Der anschließende Druckabfall würde dann zu einem Nachlassen des „Depressorreflex-Tonus" und — bei sonst gleichbleibenden Bedingungen — zum Ansteigen der Herzfrequenz noch vor Inspirationsbeginn führen (vgl. Mechelke u. Meitner). Man könnte weiterhin annehmen, daß der in einzelnen Versuchen gegen Ende der Exspiration auftretende Widerstandsabfall im Sinne von Schroeder u. Brehm am vorzeitigen Frequenzanstieg beteiligt ist. Die inspiratorische Verstärkung dieser relativ langsam entstehenden Tachykardie käme dann durch das Hinzutreten der wesentlich wirksameren, unter 1, 2 und vor allem 4a aufgeführten Faktoren zustande. Umgekehrt wäre vielleicht eine Beschränkung der durch diese Vorgänge intendierten inspiratorischen Tachykardie über den Blutdruck- und Widerstandsanstieg im letzten Abschnitt der Inspiration möglich.

Nach den Ausführungen von Schroeder u. Brehm kommt die respiratorische Arrhythmie nicht über die unter 1, 2 und 4a beschriebenen Faktoren, sondern hauptsächlich durch schnellere Füllung des rechten Vorhofs, und zwar infolge inspirationssynchroner Verminderungen des peripheren Widerstandes zustande. Die zu Schwankungen des venösen Rückflusses führenden Änderungen des Vasomotorentonus sollen durch zentrale Koppelung von Atmungs- und Vaguszentrum entstehen.

In unseren Versuchen trat nun die von Schroeder u. Brehm beschriebene Synchronisierung von Frequenzzunahme und Widerstandsabfall keineswegs regelmäßig auf (Abb. 5). Die inspiratorische Beschleunigung der Herzfrequenz ging zwar meist zu irgendeinem Zeitpunkt mit einer Widerstandsenkung einher. Enge zeitliche Übereinstimmungen waren jedoch gemäß Abb. 4a und b nur selten zu beobachten. Es kamen auch Variationen der Herzfrequenz ohne deutliche Widerstandsänderungen, in einzelnen Fällen sogar gleichzeitige Zunahmen von peripherem

* Unter effektivem Vorhofsdruck ist die Differenz zwischen dem intrathorakalen Druck in der Umgebung des Vorhofs und dem Vorhofsdruck selbst zu verstehen. Der „absolute", im Vergleich zum atmosphärischen Druck gemessene Vorhofsdruck sollte zur Beurteilung der Vorhofsfüllung bzw. -dehnung nicht herangezogen werden.

Widerstand und Herzfrequenz vor (Abb. 1 und 5b). Es fragt sich daher, ob die von Schroeder u. Brehm beschriebene umgekehrte Beziehung zwischen Herzfrequenz und peripherem Widerstand als die wesentliche Ursache der respiratorischen Arrhythmie angesehen werden kann.

Die von Schroeder u. Brehm beschriebene enge zeitliche Übereinstimmung zwischen Widerstandsänderungen und respiratorischer Arrhythmie setzt außerdem voraus, daß Widerstandsänderungen und die damit gekoppelten Variationen des venösen Rückflusses sich mit sehr geringer Latenz auf die Herzfrequenz auswirken. Die verfügbaren Daten über die Kreislaufzeit im venösen Gebiet scheinen aber

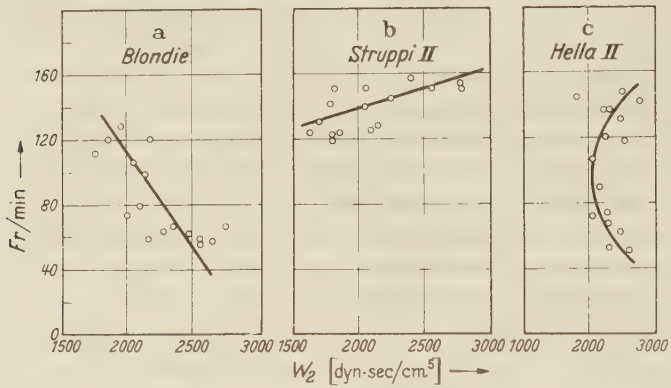


Abb. 5. Graphische Darstellung der variablen Beziehungen zwischen Herzfrequenz (Fr) und peripherem Gesamtwiderstand (W_2) bei 3 verschiedenen Hunden

dieser engen Korrelation zu widersprechen (vgl. Grinberg; Neri u. Mitarb.). Das beträchtliche Speicherungsvermögen des venösen Gefäßsystems läßt es wohl auch fraglich erscheinen, ob der bei einer Widerstandssenkung erfolgende vermehrte Bluteinstrom in die Venen überhaupt zu einer wesentlichen Erhöhung des Druckgefälles zum Herzen hin führt. Experimentelle Daten liegen hierüber jedenfalls noch nicht vor.

Zum Studium des Zusammenhanges zwischen venösem Angebot und Herzfrequenz injizierten wir in informatorischen Versuchen bei einem nichtnarkotisierten Hund stoßweise größere Flüssigkeitsmengen in die V. jugularis allein oder zusätzlich auch noch in 2 Extremitätenvenen. Das Versuchstier zeigte gewöhnlich eine ausgeprägte respiratorische Arrhythmie und mittelstarke atmungsabhängige W_2-Änderungen, die allerdings der von Schroeder u. Brehm aufgestellten Fr/W_2-Beziehung nicht gehorchten (Abb. 5c). Es wurden 50—70 cm³ körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung in 5 sec injiziert. Die Injektionsdauer entsprach etwa einem Atemzug. Die zugeführte Flüssigkeitsmenge betrug mindestens 20—35% des durchschnittlichen Sekundenvolumens bzw. des durchschnittlichen venösen Rückstroms. Der Injektionsbeginn fiel jeweils mit dem Anfang einer Inspirationsbewegung zusammen. *Die Injektion derartiger Flüssigkeitsmengen löste in keinem Fall eine Verstärkung der respiratorischen Arrhythmie oder überhaupt eine Tachykardie aus.* Daß die Herzfrequenz dieses Tieres während der Inspiration unter bestimmten Bedingungen noch beträchtlich über die Norm hinaus ansteigen kann, ging aus ihrem Verhalten beim spontanen oder medikamentös ausgelösten „tiefen Atemzug" hervor (vgl. dazu Wagenmann u. Mitarb.).

Zur Erklärung der *respiratorischen Blutdruckschwankungen* sind früher, wie schon erwähnt, vor allem atemmechanische Ursachen, von SCHROEDER u. LOSSE neuerdings zentral ausgelöste, atemsynchrone Variationen des peripheren Widerstands in den Vordergrund gestellt worden.

Die rein atemmechanischen Erklärungen der respiratorischen Blutdruckschwankung gingen im wesentlichen von atemrhythmischen Variationen des Schlagvolumens bei annähernd konstantem Widerstand aus und stützten sich dabei hauptsächlich auf die Beurteilung der Blutdruckamplitude, des diastolischen Drucks sowie der Plethysmographie von Ohr und Extremitäten [vgl. BAUEREISEN (1); MATTHES]. Danach soll der Blutdruck beim Menschen mit dem Schlagvolumen des linken Ventrikels inspiratorisch ab- und exspiratorisch zunehmen bzw. sich bei langsamer Atmung während der Inspiration mit dem Schlagvolumen biphasisch verhalten. Der Anstieg des venösen Rückflusses und damit die Zunahme der Förderleistung des rechten Herzens, die jeder länger dauernden Vermehrung des linken Schlagvolumens vorausgehen müssen, sind aber andererseits atemmechanisch eng an die Inspiration gekoppelt (EYSTER u. HICKS; SHULA u. Mitarb.). Die zeitliche Diskrepanz zwischen der Zunahme des Fördervolumens im rechten und linken Herzen (rechts im Inspirium, links im Exspirium) muß bei dieser atemmechanischen Deutung durch Zwischenschaltung irgendwelcher modifizierender Einflüsse der Lungenstrombahn erklärt werden. Diese sollen auf einer inspiratorischen Zunahme der Kapazität mit Eröffnung von Reservekapillaren und einem Widerstandsanstieg im kleinen Kreislauf beruhen (WAGNER). Dadurch würde das linke Herz trotz erhöhter Förderleistung des rechten Ventrikels zunächst weniger Blut erhalten. Die Zeit bis zur Überwindung der „Lungenbarriere" beträgt nach MATTHES beim Menschen 2,1—3,8 sec. Bei langsamer Atmung würde sich daher die inspiratorische Zunahme der Förderleistung des rechten Herzens noch gegen Ende der Inspiration auf das linke Herz und den Blutdruck auswirken können, bei rascher Atmung hingegen erst in der Exspirationsphase.

Die Allgemeingültigkeit dieser rein atemmechanischen Interpretation der respiratorischen Blutdruckschwankungen über das Schlagvolumen ist durch die Befunde von SCHROEDER u. LOSSE in Frage gestellt worden. Sie fanden nämlich mit Hilfe der physikalischen Kreislaufanalyse am Menschen in der Einatmungsphase gleichzeitig mit dem Absinken des systolischen und diastolischen Drucks keine Verminderung, sondern eine *Erhöhung* des Schlag- und Sekundenvolumens bei abfallendem peripherem und elastischem Widerstand. Die respiratorischen Blutdruckschwankungen sollen demnach hauptsächlich durch Widerstandsänderungen bedingt, d. h. vorwiegend vasomotorischer Genese sein. Eine Erklärung der respiratorischen Blutdruckschwankungen ist nach

Schroeder u. Losse, den prinzipiellen Ausführungen von Wezler u. Böger zufolge, ohne Erfassung sämtlicher Kreislaufgrößen nicht angängig.

Auch wir fanden mit den von Schroeder verwandten Methoden bei der großen Mehrzahl unserer Hunde bedeutende atemrhythmische Schwankungen des peripheren und elastischen Widerstands, die für das respiratorische Verhalten des Blutdrucks von entscheidender Bedeutung sein dürften.

Die Synchronisierung von Atemphase und W_2-Änderungen war aber, wie weiter oben ausgeführt, weniger vollkommen als z. B. die von Atemphasen und respiratorischer Arrhythmie. Man sollte daher neben der von Schroeder u. Brehm angenommenen Entstehung der atemabhängigen Widerstandsänderungen durch zentrale Koppelung vielleicht auch noch andere, vor allem reflektorische Ursachen diskutieren (Lungendehnung, Pressoreceptoren, Füllungsschwankungen der Vorhöfe oder Lungengefäße [Aviado u. Mitarb.]).

Abgesehen von den Variationen des peripheren Gefäßwiderstands sprechen beim wachen Hund noch folgende Beobachtungen gegen die rein atemmechanische Entstehung der respiratorischen Blutdruckschwankungen:

1. Es bestand zwischen der inspiratorischen, auf Grund atemmechanischer Vorgänge zu erwartenden Vermehrung des Blutangebots zum rechten Herzen und dem Anstieg des Blutdrucks — im Gegensatz zu den Befunden von Matthes am Menschen — keine konstante Latenz. Die Zeitspanne zwischen Inspirationsbeginn und Anfang des Blutdruckanstiegs schwankte vielmehr in unseren Versuchen zwischen 2 und 4,5 sec. Diese Schwankungen fallen aber wegen der rascheren Atemfrequenz des Hundes hier besonders stark ins Gewicht.

2. Selbst die Zunahme der Förderleistung* war mit dem Inspirationsbeginn nicht eindeutig koordiniert (Abb. 4d). Dementsprechend war der zeitliche Verlauf der Sekundenvolumänderungen auch nicht von der Atemfrequenz abhängig — im Gegensatz zu den Verhältnissen am Menschen, wo eine derartige Koppelung beschrieben und als Stütze für die atemmechanische Erklärung der respiratorischen Blutdruckschwankungen herangezogen wurde.

3. Vergleicht man schließlich die atemphasischen Änderungen von Blutdruck und Sekundenvolumen, so zeigt sich, daß sogar diese Größen nicht synchron variieren und auch sonst in keiner konstanten zeitlichen Beziehung zueinander stehen.

Der Atemmechanik kann allerdings nicht jede Bedeutung für den Ablauf der Atemschwankungen einzelner Kreislaufgrößen abgesprochen

* Das Schlagvolumen, dessen atemphasische Änderungen sich in zeitlicher Hinsicht deutlich von denen des Sekundenvolumens unterschieden, kann in unseren Versuchen — im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Menschen — wegen der stärkeren respiratorischen Arrhythmie des Hundes zur Beurteilung der Förderleistung nicht herangezogen werden.

werden. So macht z. B. die bei der Mehrzahl unserer Versuche gleich nach Inspirationsbeginn beobachtete Beschleunigung der Sekundenvolumzunahme einen atemmechanischen Zusammenhang mit der inspiratorisch vermehrten Förderleistung des rechten Ventrikels sehr wahrscheinlich (Abb. 4d). Auffallend ist bei einer solchen Deutung allerdings die sehr kurze Latenz zwischen Inspirationsbeginn und zusätzlicher Steigerung des Sekundenvolumens. Auch die Tatsache, daß mit Beginn der Exspiration das Sekundenvolumen ausnahmslos absank, ließe sich atemmechanisch durch den exspiratorisch verringerten venösen Einstrom ins rechte Herz erklären. Dabei wäre allerdings wieder nur eine sehr kurze Latenz bzw. geringe Blutspeicherung in der Lunge anzunehmen.

Aus älteren Untersuchungen von Hochrein u. Keller scheint nun tatsächlich hervorzugehen, daß dem kleinen Kreislauf des Hundes nur eine geringe Bedeutung als verzögernder Faktor für die Blutverschiebung vom rechten zum linken Herzen zukommt. Bei gleichzeitiger Registrierung des Durchflusses an Pulmonalarterie und Pulmonalvene fanden diese Autoren, daß nicht nur der Zufluß, sondern auch der Ausfluß aus der Lunge inspiratorisch vermehrt und exspiratorisch vermindert ist. Die Verzögerung würde sich aus ihren Daten auf höchstens 0,5 sec errechnen. Damit würde übereinstimmen, daß die Lunge beim Hund als Blutspeicher offenbar eine geringere Rolle spielt als beim Menschen (vgl. Nylin; Sjöstrand; Rahn u. Mitarb.).

Vielleicht ist für die Zunahme des Sekundenvolumens sofort nach Inspirationsbeginn auch ein von Opdyke u. Mitarb. (1) beschriebener, noch ungeklärter Befund von Bedeutung. Diese Autoren fanden, ähnlich wie Glaviano nach Eröffnung einer arteriovenösen Fistel, daß beim narkotisierten Hund Infusionen in den rechten Vorhof praktisch ohne Latenz, d. h. schon beim nächsten Herzschlag, die Förderleistung des linken Herzens vermehren. Sekundär wäre dann eine weitere inspiratorische Erhöhung des Sekundenvolumens vom rechten Herzen her über eine relativ rasche Lungenpassage denkbar.

Die modifizierende Rolle des kleinen Kreislaufs läßt sich allerdings an Hand der lückenhaften experimentellen Daten vor allem im Hinblick auf gewisse Reaktionen der Förderleistung nicht einwandfrei beurteilen. Das gilt besonders für den schon während der Exspiration einsetzenden Anstieg des Sekundenvolumens sowie die seltenen Ausnahmen mit Abfall des Sekundenvolumens noch vor Ende der Inspiration.

Zusammenfassung

Die respiratorischen Kreislaufveränderungen von nichtnarkotisierten Carotisschlingenhunden wurden mit den Methoden von Schroeder zur Kreislaufanalyse nach Wezler u. Böger untersucht.

Die respiratorischen Herzfrequenz- und Blutdruckschwankungen entsprachen dem bekannten Verhalten: Die *Herzfrequenz* nahm inspiratorisch zu und exspiratorisch ab; der *Blutdruck* fiel während der Inspiration und stieg während der Exspiration. Bei langsamer Atmung erfolgte schon während der Inspiration ein sekundärer Druckanstieg.

Das *Schlagvolumen* nahm vorwiegend inspiratorisch ab und exspiratorisch zu, verhielt sich allerdings häufig zweiphasisch.

Das *Sekundenvolumen* wurde weniger vom Schlagvolumen als von der Herzfrequenz geprägt und stieg daher wie diese in der Inspiration meist monophasisch an. Der exspiratorische Verlauf war dagegen zweiphasisch mit sekundärem Wiederanstieg.

Der *elastische und periphere Widerstand* zeigte — entsprechend den Angaben von Schroeder — deutliche atemrhythmische Schwankungen, die meist zweiphasisch waren.

Zwischen den atemrhythmischen Schwankungen von W_2 und Herzfrequenz bestanden keine konstanten Beziehungen. Es müssen daher am Entstehen der respiratorischen Arrhythmie neben der Zunahme des venösen Rückstroms durch Widerstandssenkung (Schroeder) auch noch andere Faktoren maßgeblich beteiligt sein. So wird vor allem die Bedeutung des atemmechanisch ausgelösten Bainbridge-Reflexes diskutiert.

Am Entstehen der respiratorischen Blutdruckschwankungen sind neben den früher in den Vordergrund gestellten atemmechnischen Ursachen, welche sich über die Förderleistung des linken Herzens auswirken sollten, auch die von Schroeder beschriebenen Veränderungen des peripheren und elastischen Gefäßwiderstands maßgeblich beteiligt.

Literatur

Anrep, G. V., W. Pasqual and R. Rössler: Proc. Roy. Soc., Lond. **119**, 191 (1936). — Aviado, D. M., T. H. Li, W. Kalow, C. F. Schmidt, G. L. Turnbull, G. W. Peskin, M. E. Hess and A. J. Weiss: Amer. J. Physiol. **165**, 261 (1951). — Bainbridge, F. A.: Brit. J. Physiol. **54**, 192 (1920). — Bauereisen, E. (1): Arch. Kreislaufforsch. **14**, 306 (1948). — (2): Pflügers Arch. **257**, 108 (1953). — Bjurstedt, H., u. L. M. Hesser: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, 180 (1953). — Brecher, G. A., and G. Mixter jr.: Amer. J. Physiol. **172**, 457 (1953). — Brendel, W., u. E. Koppermann: Pflügers Arch. **258**, 121 (1953). — Duomarco, J., R. Rimini and F. N. Predari; zit. nach Opdyke, D. F., H. F. van Noate and G. A. Brecher: Amer. J. Physiol. **162**, 259 (1950). — Eyster, J. A. E., and E. V. Hicks: Amer. J. Physiol. **104**, 358 (1933). — Foà, C.: Pflügers Arch. **153**, 513 (1913). — Glaviano, V. V.: Amer. J. Physiol. **179**, 268 (1954). — Grinberg, A.; zit. nach Ber. Physiol. **118**, 429 (1940). — Heymans, C., J. J. Bouckaert et A. Samaan: Arch. internat. Pharmacodynamie **48**, 457 (1934). — Hochrein, M., u. C. J. Keller: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **164**, 529 (1932). — Holt, J. P.: Amer. J. Physiol. **134**, 292 (1941). — MacCanon, D. M., and S. M. Horvarth: Amer. J. Physiol. **168**, 612 (1952). — Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden. Stuttgart 1951. — Mechelke, K., u. H. J. Meitner: Z. exper. Med. **115**, 287 (1950). — Mixter jr., G.: Amer. J. Physiol. **172**, 446 (1953). — Müller, A.: Arch. Kreislaufforsch. **19**, 220 (1953). — Neri, R. J., G. Villagordoa, G. Moros and N. Dorbecker: Amer. Heart J. **47**, 818 (1954). — Nylin, G.; zit. nach Ber. Physiol. **140**, 82 (1950). — Opdyke, D. F.,

J. Duomarco, W. H. Dillon, H. Schreiber, R. C. Little and R. D. Seely (1): Amer. J. Physiol. **154**, 258 (1948). — Opdyke, D. F., H. F. van Noate and G. A. Brecher (2): Amer. J. Physiol. **162**, 259 (1950). — Patras, M. C., J. M. Brookhart and T. E. Boyd: Amer. J. Physiol. **142**, 52 (1944). — Rahn, H., R. C. Stroud and H. Meier: J. Appl. Physiol. **5**, 308 (1952). — Saalfeld, E. v.: Pflügers Arch. **231**, 33 (1932). — Schroeder, W. (1): Arch. Kreislaufforsch. **15**, 24 (1949). — (2): Z. exper. Med. **117**, 181 (1951). — Schroeder, W., u. H. Brehm: Pflügers Arch. **255**, 114 (1952). — Schroeder, W., u. H. Losse: Pflügers Arch. **258**, 1 (1953). — Shula, R. H., C. Ensor, R. E. Cunning, M. G. Moss and V. Johnson: Amer. J. Physiol. **137**, 620 (1942). — Sjöstrand, T.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **22**, 114 (1951). — Wagenmann, U., E. Gerstenberg, E. Schmid u. R. Taugner: In Vorbereitung. — Wagner, R.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **13**, 7 (1940). — Wezler, K., u. A. Böger: Erg. Physiol. **41**, 292 (1939).

Dr. U. Wagenmann, Heidelberg, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 536—543 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität von Mailand
(Direktor: Prof. E. Trabucchi)

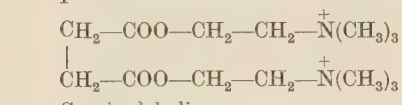
Über die curareähnliche Wirkung eines Disulfoniumabkömmlings, des Succinyl(bis)Sulfacholins

Von
D. Della Bella, R. Villani und G. F. Zuanazzi

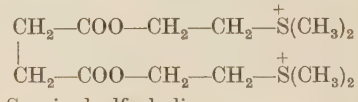
Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juli 1956)

Im Verlaufe von Untersuchungen, welche den Zweck verfolgten, die Bedeutung der „onium"-Struktur für das Auftreten einiger typischer Wirkungen an den cholinergischen Schaltstellen zu demonstrieren[11, 12], hielten wir es für interessant, ein dem Succinylcholin analoges Derivat, in welchem der Stickstoff durch Schwefel substituiert ist, zu synthetisieren und auf seine pharmakologischen Eigenschaften hin zu überprüfen*.



Succinylcholin



Succinylsulfacholin

Die Ergebnisse vorläufiger Untersuchungen über die allgemeinen pharmakologischen Eigenschaften dieser Verbindung haben wir bereits mitgeteilt. Der entscheidende Zug im Wirkungsbild dieses Stoffes ist die curareartige Aktivität (die Dosis von 2 mg/kg i.v. lößt am Kaninchen das klassische „head drop"-Phänomen aus); weiterhin wirkt diese Substanz acetylcholin-artig auf den Froschrectus und schließlich besitzt sie eine nicotin-ähnliche Wirkung (und zwar sowohl „in vivo" — Blutdruck der Katze —, als auch „in vitro" — isolierter Kaninchendarm —).

Im Gegensatz zum Succinylcholin wird das Disulfoniumderivat weder von der Serum- noch von der Nervencholinesterase hydrolysiert; noch wird es in einer biologisch inaktiven Form von den Proteinen des Rattenblutes gebunden[13].

Mit dem Ziel, den Wirkungsmechanismus des curarisierenden Effekts des Succinylsulfacholins besser aufzuklären, unterzogen wir diese Substanz einer eingehenden pharmakologischen Untersuchung.

Methodik

Ein Teil unserer Versuche wurde am n. ischiadicus — m. tibialis-anterior-Präparat des künstlich beatmeten Kaninchens in Chloralose-Anaesthesie (80 mg/kg i.v.) durchgeführt. In anderen Versuchen benutzten wir die ebenfalls mit Chloralose narkotisierte Katze: hier präparierten wir öfters den m. tibialis ant. nach der von Brown

* Für die synthetische Darstellung des vorliegenden Präparates, welches 1953 von Protiva u. Mitarb. erstmalig beschrieben wurde[21], danken wir Herrn Dr. D'Amico von der Forschungsabteilung des Laboratorio Bioterapico Milanese.

angegebenen Technik[7], welche es ermöglicht, die zu untersuchende Substanz auf intraarteriellem Wege an die zu untersuchende Muskelgruppe heranzubringen. Die Einspritzung erfolgte in diesen Fällen, gegen den Blutstrom gerichtet, in die zuführende Arteria tibialis ungefähr auf der Höhe des talo-crural-Gelenks. Ein Haltefaden, welcher unterhalb des Knies um die Arterie geschlungen wurde, ermöglichte es durch einfachen Zug, den Blutkreislauf zu unterbrechen und auf diese Weise die injizierte Substanz für einige Sekunden mit dem Muskel in Kontakt zu bringen. Das Bein des Kaninchens oder der Katze wurde an einem BROWN-SCHUSTER-Myographen und die Muskelzuckung mittels eines isometrischen Hebels aufgezeichnet. Für die elektrische Reizung der Präparate wurde ein Elektronenimpulsgenerator benutzt, der annähernd rechteckige Impulse variabler Frequenz und Breite liefert. Es kamen sowohl Einzelreize (Frequenz: 6—8 Reize/min; Reizungsdauer: 0,5 sec), als auch tetanisierende Reizungen (Frequenz: 120 bis 150 Reize/sec für die Dauer von 5 sec) zur Anwendung.

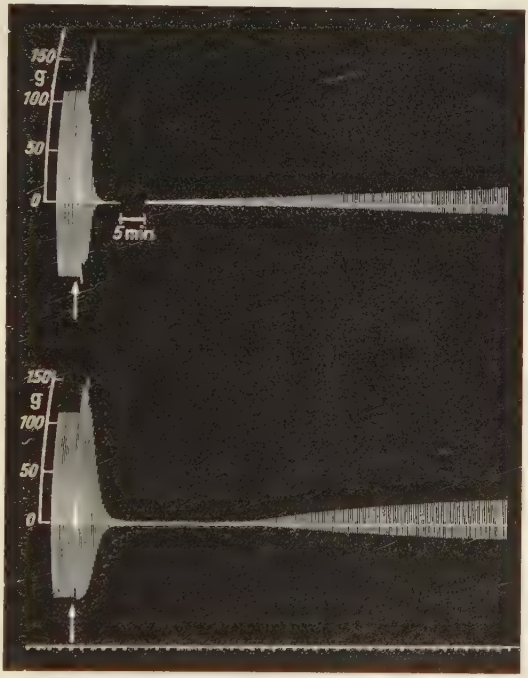


Abb. 1. Kaninchen, 2,700 kg. Narkose: Chloralose 80 mg/kg i.v. Künstl. Atmung. N. ischiadicus — m. tibialis ant.-Präparat. Obere Kurve: M. tibialis ant., indirekte Reizung mittels isolierter Reize. Pfeil: Succinylsulfacholin 4 mg/kg i.v. Untere Kurve: Wie oben. Pfeil: Succinylcholin 400 γ/kg i.v.

Die gewonnenen Ergebnisse sollen an Hand einiger aufschlußreicher Kurven besprochen werden.

Abb. 1 zeigt, auf welche Weise die neuromuskuläre Erregbarkeit am Kaninchen (n. ischiadicus — m. tibialis ant.-Präparation) durch die i.v. Verabreichung von Succinylsulfacholin (4 mg/kg) (obere Kurve) und Succinylcholin (400 γ/kg) (untere Kurve) beeinflußt wird. Die curareartige Wirkung des in etwa 10facher Dosis zugeführten Succinylsulfacholins ist erheblich stärker und länger anhaltend als die des Succinylcholins. Wie bereits berichtet[13, 4], fanden wir im Kaninchen ein „head drop" — wobei das Verhältnis wirkungsgleicher Dosen 10 : 1 war. Das Aktivitäts-Dosenverhältnis war größer als in den Vorversuchen, in welchen wir die Dosen beider Substanzen im „head drop"-Test bestimmten. Diese relativ stärkere Wirkungsintensität und Wirkungsdauer des Succinylsulfacholins in Dosen, welche

die minimal wirksame Dosis überschreiten, läßt sich vielleicht am besten mit einem verschiedenen Verhalten der beiden Stoffe gegenüber den Systemen der Cholinesterase erklären, mit anderen Worten, das Succinylcholin unterliegt wohl einer verhältnismäßig schnelleren enzymatischen Hydrolyse als das Succinylsulfacholin[5, 16].

Abb. 1 zeigt weiterhin, daß nach i.v. Zufuhr sowohl von Succinylcholin als auch von Succinylsulfacholin, dem Einsetzen des lähmenden Effekts eine unmittelbar nach dem Einspritzen auftretende Muskelkontraktion vorausgeht. Dieses Phänomen ist wohl so aufzufassen, daß auch das Succinylsulfacholin seine curareartige Wirkung auf dem Umwege über einen acetylcholinartigen Mechanismus, d. h. eine Dauerdepolarisation, ausübt.

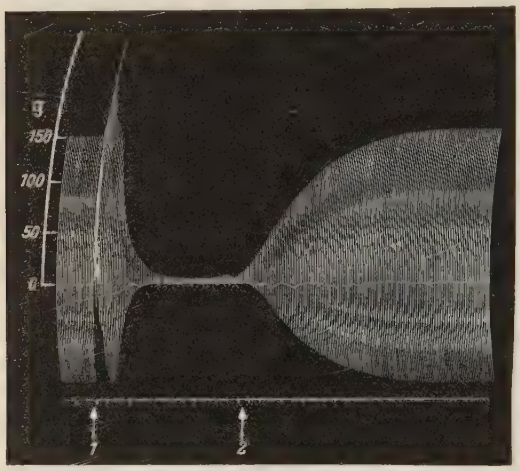


Abb. 2. Kaninchen, 2,300 kg. Narkose usw. wie Abb. 1. 1. Succinylsulfacholin 3 mg/kg i.v. 2. d-Tubocurarin 50 γ/kg i.v.

In Abb. 2 sieht man, daß die durch Succinylsulfacholin hervorgerufene fast komplette Lähmung schnell und gründlich durch Zufuhr von d-Tubocurarin aufhebbar ist.

Sehr wichtig erscheint uns in diesem Zusammenhang auch der in Abb. 3 wiedergegebene Fall. Hier zeigt sich, daß umgekehrt auch das Succinylsulfacholin sehr wohl dazu befähigt ist, den durch d-Tubocurarin ausgelösten Effekt, je nach Höhe der angewandten Dosis, ganz oder teilweise aufzuheben. Das Succinylsulfacholin zeigt folglich, in voller Analogie, den gleichen reziproken Antagonismus, wie er bezüglich der curarisierenden Wirkung zwischen Dekamethonium und d-Tubocurarin zu beobachten ist[8, 10, 18, 20].

Behandelt man mit Succinylsulfacholin teilweise paralysierte Präparate mit Prostigmin, so bleibt, im Gegensatz zu dem, was man nach gewöhnlichen Curarepräparaten vom acetylcholinmimetischen Wirkungstyp beobachtet, eine additive, d. h. synergistische Prostigminwirkung aus (Abb. 4). Anderseits zeigt die wiederholte indirekte tetanische Reizung des teilweise curarisierten Präparates, wenigstens anfangs, eine ziemlich deutliche antagonistische Wirkung (Abb. 5).

Die Ansichten stimmen heute im allgemeinen darin überein, daß sowohl die Behandlung mit Prostigmin, als auch die indirekte Tetanisierung sehr wohl den durch „echtes" Curare ausgelösten Effekt aufzuheben vermögen[1, 3, 6, 14, 17, 11], anderseits aber die über einen acetylcholinmimetischen Mechanismus verursachte

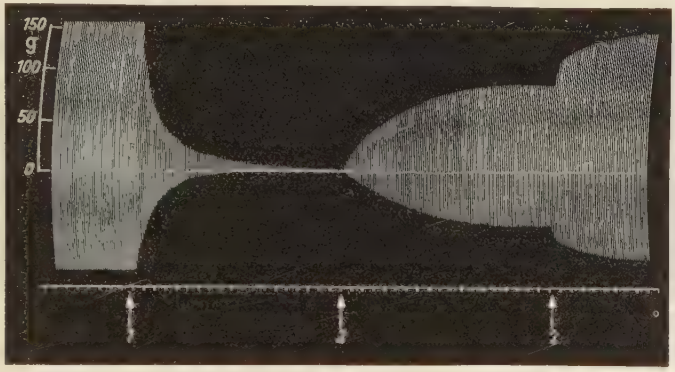


Abb. 3. Kaninchen, 2,420 kg. Narkose usw. wie Abb. 1. 1. d-Tubocurarin 250 γ/kg i.v. 2. Succinylsulfacholin 2,5 mg/kg i.v.

curareartige Lähmung entweder überhaupt nicht beeinflussen oder sogar noch verstärken[20]. Die übliche Interpretation dieses Verhaltens ist bekannt.

Im Falle des Prostigmins läßt sich das Ausbleiben des Additiveffekts beider Curarewirkungen vielleicht teilweise dadurch erklären, daß das Succinylsulfacholin von der Cholinesterase nicht angegriffen wird; freilich hilft diese Erklärung uns nicht den entgiftenden Einfluß wiederholter indirekter tetanischer Reize zu verstehen.

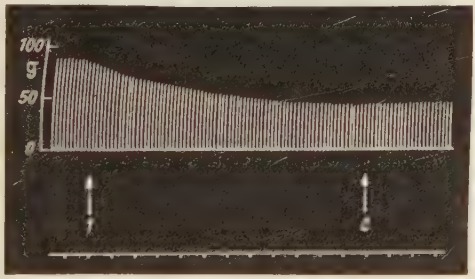


Abb. 4. Kaninchen, 2,500 kg. Narkose usw. wie Abb. 1. 1. Succinylsulfacholin 2,5 mg/kg i.v. 2. Prostigmin 100 γ/kg i.v.

In einer Reihe von Untersuchungen am m. tibialis ant.-Präparat der Katze (Brownsche Technik) versuchten wir darüber Aufschluß zu gewinnen, wie sich die durch Succinylsulfacholin hervorgerufene Lähmung gegenüber wiederholter tetanischer Reizung sowie der Zufuhr von Acetylcholin oder von Kaliumionen (Substanzen, welche durch tetanische Reizung freigesetzt werden) verhalten würde. Die erzielten Resultate sind in den Abb. 6, 7 und 8 wiedergegeben.

Abb. 6 zeigt, daß das Succinylsulfacholin selbst einen typischen „Twich" hervorzurufen vermag. Weiterhin ist in dieser Abbildung ersichtlich, daß tetanisierende Reize auch in diesem Falle eine Erregbarkeitssteigerung des Präparates auf indirekte Reize hin auszulösen

vermögen. Aus Abb. 7 geht hervor, daß die Zufuhr von Kaliumionen augenscheinlich die Decurarisierung begünstigt.

Abb. 8 demonstriert schließlich, wie sehr die Sensibilität gegen retrograd intraarteriell injiziertes Acetylcholin dem Auftreten des Curare-

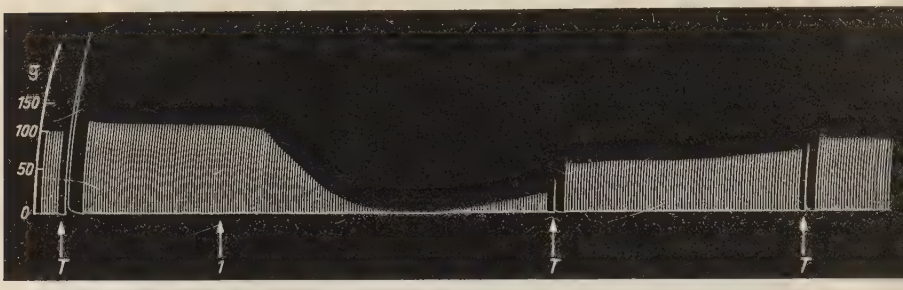


Abb. 5. Kaninchen, 2,500 kg. Narkose usw. wie Abb. 1. M. tibialis ant. indirekte Reizung mittels isolierter Reize *und* mittels tetanisierender Reize (T). 1. Succinylsulfacholin 3 mg/kg i.v.

Effekts parallel läuft. Wiederholte Acetylcholineinspritzungen zögern das Abklingen der Curarewirkung wesentlich hinaus.

Die Aufhebung oder den Additiveffekt der Curarewirkung betrachtet man im Falle der indirekten Tetanisierung als Folge der durch die über die motorischen Fasern einlaufenden Erregung an den motorischen Endplatten hervorgerufenen

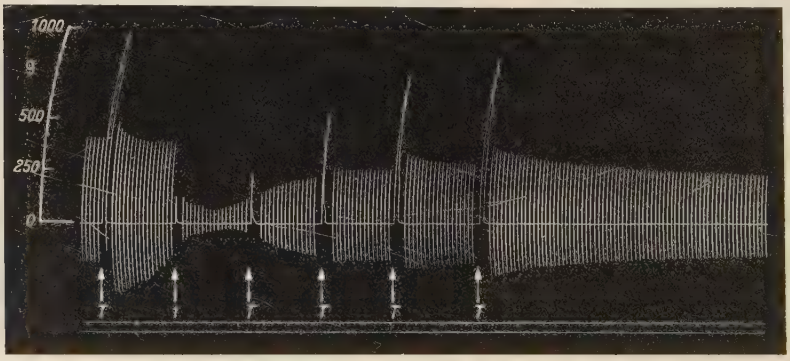


Abb. 6. Katze, 2,700 kg. Narkose wie Abb. 1. N. ischiadicus — m. tibialis ant.-Präparat mit isolierter a. tibialis nach Brown. wie Abb. 5. 1. Succinylsulfacholin 50 γ retrograd intraarteriell. Nach Succinylsulfacholin in die Arterie beobachtet man das Auftreten einer typischen Zuckung

Acetylcholinausschüttung und vermehrten Freisetzung von Kaliumionen; im Falle des Prostigmins entweder als Folge einer verlängerten Erhaltung des Acetylcholins in den Synapsen und zwar durch spezifische Hemmung der Cholinesterasetätigkeit[2, 9], oder, was wahrscheinlicher ist, als Folge des Auftretens entweder eines direkten acetylcholinähnlichen Effekts, oder aber indirekt über eine „Sensibilisierung" der Receptoren gegenüber dem erregungsübertragenden Stoff[15 22, 23, 24, 25].

Besprechung und Schlußfolgerungen

Aus den oben angeführten Versuchen geht klar hervor, daß das Succinylsulfacholin grundsätzlich, vor allem was die curarisierende Wirkung anbetrifft, ein dem Succinylcholin analoges pharmakologisches Bild

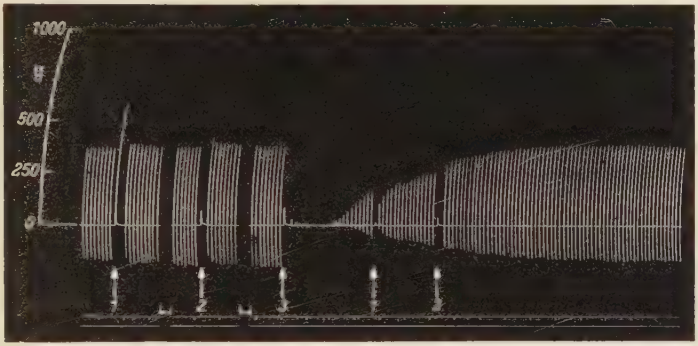


Abb. 7. Katze, 2,550 kg. Narkose und Präparation wie Abb. 6. 1. Acetylcholin 3 γ retrograd intraarteriell. 2. KCl 3 mg retrograd intraarteriell. 3. Succinylsulfacholin 60 γ retrograd intraarteriell

aufweist. Spritzt man diesen Stoff i.v. künstlich beatmeten, narkotisierten Kaninchen ein, so zeigt er eine zweiphasige Wirkung. Nach kurzdauernder, nur wenige Augenblicke anhaltender Steigerung der Muskelerregbarkeit indirekten Reizen gegenüber, folgt sehr schnell eine alle Merkmale der Curarisierung aufweisende Phase. Bei gleichbleibender Wirkungsintensität zeichnet sich der Succinylsulfacholineffekt gegenüber

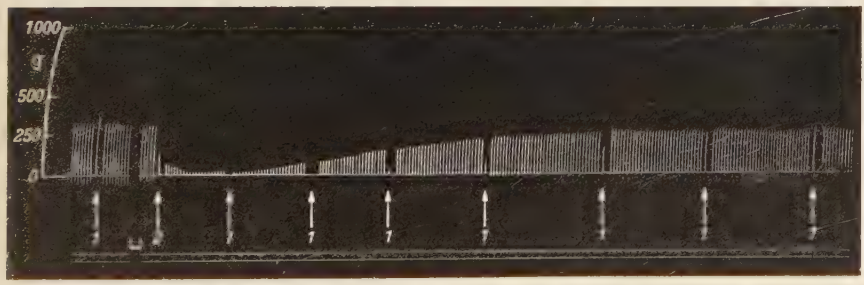


Abb. 8. Katze, 2,300 kg. Narkose: Chloralose 80 mg/kg i.v. Künstl. Atmung. N. ischiadicus — m. tibialis ant.-Präparat mit isolierter a. tibialis nach Brown. 1. Acetylcholin 2,5 γ retrograd intraarteriell. 2. Succinylsulfacholin 50 γ retrograd intraarteriell

der Succinylcholinwirkung durch eine wesentlich größere Dauer aus. Ferner konnte demonstriert werden, daß ein echtes Curarepräparat, wie zum Beispiel das d-Tubocurarin die Succinylsulfacholincurarisierung vollständig zu beseitigen vermag; dieser Antagonismus tritt auch umgekehrt auf, d. h. auch das Succinylsulfacholin ist imstande, die durch

echtes Curare ausgelösten Lähmungen aufzuheben. Die curarisierende Wirkung des Succinylsulfacholins läßt sich weder durch Prostigmin beeinflussen, noch wird sie durch Applikation indirekter tetanischer Reize verstärkt; im Gegenteil, solche Reize heben teilweise den curarisierenden Effekt auf.

Ein dem durch i.v. Zufuhr von Succinylsulfacholin ausgelösten völlig gleichartiges Wirkungsbild erhält man, wenn man die Substanz durch intraarterielle Injektion (nach Brown), direkt an die zu untersuchende Muskelgruppe heranbringt. Auch in diesem Falle findet man, daß tetanisierende Reize, wenn überhaupt, entgiftend auf das Präparat einwirken. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß eine bis zu einem gewissen Grade dem durch tetanisierende Reize hervorgerufenen Effekt qualitativ gleichartige Wirkung durch lokal eingespritzte Kaliumionen erzielt werden kann.

Die lokale Verabfolgung von Acetylcholin führt auch nach Einsetzen der Succinylsulfacholinwirkung zur Muskelerregung; dieser Effekt nimmt dem Wiederauftreten der indirekten Erregbarkeit parallellaufend, progressiv an Intensität zu.

Zusammenfassend darf man sagen, daß den bisherigen Untersuchungen zufolge das Succinylsulfacholin als curarisierende Substanz einen scharf umrissenen Wirkungstyp besitzt und sich ausgezeichnet in die Gruppe der curareartig wirkenden Pharmaka einreihen läßt. Nichtsdestoweniger weist es einige durchaus eigene Wesensmerkmale auf und trägt so in gewissem Sinne dazu bei, die Grenzen eines vielleicht zu eng gezogenen Schemas der curareverwandten Substanzen zu erweitern.

Als curarisierende Substanz ist das Succinylsulfacholin in die Gruppe der Substanzen mit acetylcholinartigem Wirkungstyp, welche durch Dauerdepolarisation wirken, einzureihen; in diesem Sinne ist auch der ausgeprägte Antagonismus dieses Stoffes gegen d-Tubocurarin zu verstehen. Vor dem Succinylcholin zeichnet sich das Succinylsulfacholin durch die längere Wirkungsdauer des Curare-Effekts aus, wobei schwer zu entscheiden ist, bis zu welchem Grade diese länger anhaltende Wirkung auf eine gewisse Insensibilität der Substanz gegenüber der Cholinesterase zurückzuführen ist. Es lohnt sich hier nochmals herauszustellen, daß auch in unserem Falle der Insensibilität gegenüber der Cholinesterase ein Ausbleiben synergistischer Wirkungen von seiten von Präparaten der Eserin-Gruppe parallel geht.

Das soll keinesfalls heißen, daß die Pharmaka der Eserin-Gruppe ihre potenzierende Wirkung auf die Aktivität acetylcholinartiger Curare-Stoffe, sowie die Inhibition der Wirkung echter Curare-Stoffe etwa über die Blockade der Cholinesterase ausüben würden; es sollte vielmehr ausschließlich ein gewisser Parallelismus herausgestellt werden, welcher in einer Analogie chemischer Affinitäten seine Erklärung finden könnte. Vom praktischen Standpunkt aus dürfte, vor allem im

Hinblick auf die eventuelle klinische Anwendung, den beiden hauptsächlichen pharmakologischen Wesensmerkmalen, d. h. der langanhaltenden Wirkung und dem selektiv langandauernden Antagonismus gegen d-Tubocurarin, eine nicht unerhebliche Bedeutung beizumessen sein.

Riassunto

Gli Autori riferiscono i risultati ottenuti in ricerche eseguite allo scopo di chiarire le caratteristiche dell' azione curarica svolta da un derivato analogo alla succinilcolina, ma nel quale l'azoto è stato sostituito dallo solfo: la succinilsolfocolina.

Da tali risultati appare assai chiaramente che il nuovo derivato conserva proprietà analoghe a quelle del derivato azotato, comportandosi quindi come un curaro ad azione acetilcolinomimetica.

La d-tubocurarina riesce a togliere in pieno il curarismo da succinilsolfocolina, e l'antagonismo si svolge anche in senso opposto. L'effetto curarico della succinilsolfocolina non appare inoltre modificato dalla prostigmina, e non viene aggravato dopo applicazione di stimoli tetanizzanti.

In esperienze eseguite sul m. tibiale anteriore di gatto secondo la tecnica di Brown, vengono studiate le modificazioni che il nuovo derivato può apportare alle risposte da acetilcolina e da potassio.

Literatur

[1] Aeschlimann, J. A., and M. Reinert: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **43**, 413 (1931). — [2] Blaschko, H., E. Bülbring and T. C. Chou: Brit. J. Pharmacol. **4**, 29 (1949). — [3] Boehm, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **35**, 16 (1895). — [4] Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino, V. G. Longo u. M. Moratta: Rend Ist. Sup. Sanità **12**, 106 (1949). — [5] Bovet-Nitti, F.: Rend. Ist. Sup. Sanità **12**, 138 (1949). — [6] Boyd, T. E.: Amer. J. Physiol. **100**, 569 (1932). — [7] Brown, G. L.: J. of Physiol. **92**, 22 (1938). — [8] Burns, B. D., W. D. Paton et M. V. Dias: Arch. Sci. physiol. **3**, 609 (1949). — [9] Bülbring, E., and T. C. Chou: Brit. J. Pharmacol. **2**, 8 (1947). — [10] Dallemagne, M. J., and E. Philippot: Brit. J. Pharmacol. **7**, 601 (1952). — [11] Della Bella, D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 335 (1955). — [12] Della Bella, D., R. Villani e G. F. Zuanazzi: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **31**, 703 (1955). — [13] Della Bella, D., R. Villani e G. F. Zuanazzi: Boll. Soc. ital. Biol. sper. 1956 im Druck. — [14] Eccles, J. C., B. Katz and S. W. Kuffler: J. of Neurophysiol. **4**, 362 (1941). — [15] Ferrari, W.: Boll. Soc. Med. Chir. Modena **46**, 389 (1946). — [16] Fraser, P. J.: Brit. J. Pharmacol. **9**, 429 (1954). — [17] Hutter, O. F.: J. of Physiol. **118**, 216 (1952). — [18] Hutter, O. F., and J. E. Pascoe: Brit. J. Pharmacol. **6**, 691 (1951). — [19] Koppanyi, T., and A. E. Vivino: Science (Lancaster, Pa.) **100**, 474 (1944). — [20] Paton, W. D., and E. J. Zaimis: Brit. J. Pharmacol. **4**, 381 (1949). — [21] Protiva, M., J. Pliml and P. Finglova: Chem. Listy **47**, 1197 (1953). — [22] Randall, L. O., and G. Lehman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **99**, 16 (1950). — [23] Riker, W. F., and W. C. Wescoe: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **88**, 58 (1946). — [24] Riker, W. F., W. C. Wescoe and M. J. Brothers: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **97**, 190 (1949). — [25] Zaimis, E. J.: J. of Physiol. **112**, 176 (1951).

Dr. D. Della Bella, Mailand, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 544—555 (1956)

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Direktor: Prof. Dr. F. Jung)

Pharmakologische Untersuchungen an Interoreceptoren

Von

H. Matthies, B. Wiegershausen, G. Otto und G. Scholz

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Juli 1956)

Seit den Arbeiten von Traube und Hering in der Mitte des vorigen Jahrhunderts werden receptive Endorgane des Nervensystems in den inneren Organen als eine Voraussetzung für die Steuerung und Koordination der Funktionen des Organismus gefordert. Heymans konnte dann 1930 durch seine Versuche mit dem isoliert durchströmten Carotissinus das Vorhandensein von Chemoreceptoren nachweisen. De Castro führte eingehende Untersuchungen über den anatomischen Bau und die histologische Struktur dieser Chemoreceptoren durch. Seit dieser Zeit wurden die Interoreceptoren eingehend im Hinblick auf ihre Bedeutung für bestimmte Regulationsmechanismen der Atmung und des Kreislaufs untersucht. Die Aufklärung der physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des eigentlichen Receptorenfeldes hingegen stand, im Gegensatz zu den sehr gründlichen Arbeiten über die Vorgänge an den ganglionären Synapsen sowie an den vegetativen Endorganen mit effectorischer Funktion, bisher noch aus. Wir stellten uns die Aufgabe, diese Lücke schließen zu helfen.

Den Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen bildeten die Arbeiten von Tschernigowski (1—3) über die Wirkungen von Acetylcholin (Ach.), Nicotin und Histamin auf die Interoreceptoren der Milz und des Darmes und die dadurch hervorgerufenen reflektorischen Reaktionen von seiten des Blutdrucks, der Pulsfrequenz, der Atmung und der verschiedenen inneren Organe. Tschernigowski kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß bestimmte Interoreceptoren der inneren Organe auf chemische Substanzen reagieren, ähnlich wie die des Glomus caroticum, das ja einen besonders spezialisierten Interoreceptor darstellt. Er konnte auch durch Versuche am gekreuzten Kreislauf zweier Tiere zeigen, daß diesen Interoreceptoren eine Bedeutung für die Steuerung der Funktionen des intakten Organismus zukommt. In unseren Untersuchungen richteten wir unsere Aufmerksamkeit nicht so

sehr auf die Regulationsmechanismen, sondern vielmehr auf die besonderen Eigenschaften des Interoreceptorenfeldes, wobei wir uns der pharmakologischen Analyse dieser Eigenschaften bedienten.

Methodik

Die Versuche wurden an Katzen in Urethannarkose durchgeführt. Wir nahmen in den verschiedenen Versuchsreihen jeweils eine Isolierung des Dünndarms, der Milz oder einer der Hinterextremitäten vor, und zwar so, daß unter weitestgehender Schonung der nervalen Verbindungen eine vollständige Trennung vom Kreislauf erfolgte. Die so isolierten Organe wurden dann mit Tyrodelösung perfundiert, wobei alle Kautelen für eine solche Perfusion beachtet wurden. Besonders wurde auch darauf gesehen, daß die in den Nervenscheiden der größeren Nervenstämme verlaufenden Gefäße durchtrennt wurden. Bei der Isolierung der Hinterextremität wurde der Femur in seinem oberen Drittel durchsägt, um eine Verbindung zum Hauptkreislauf über das Mark und die periostalen Gefäße zu verhindern. Die freipräparierten Nerven wurden durch ständige Befeuchtung mit physiologischer Salzlösung vor dem Austrocknen bewahrt. Der Perfusionsdruck betrug 150 cm Wasser. Die Injektion der Pharmaka erfolgte in den arteriellen Zuführungsschlauch des perfundierten Systems unmittelbar vor der Kanüle, oder in die kanülierte Vena femoralis. Der Blutdruck im Hauptkreislauf wurde mit einem Federmembranmanometer an der Arteria carotis gemessen und auf einem Rußkymographion registriert. Bei den Versuchen am isolierten Darm erfolgte die Messung der Kontraktionen des isolierten und des in Verbindung mit dem Hauptkreislauf stehenden Darmabschnitts mittels eingebundener Gummiballons und Mareyscher Kapseln.

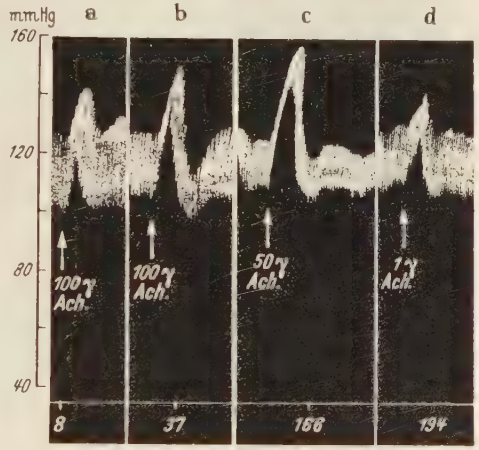


Abb. 1. Isolierter Darm (Versuch VII, Katze in Urethannarkose). *a* Ach.-Effekt zu Beginn des Versuchs; *b* nach der 1. Arterenolgabe (250 γ); *c* nach der 6. Arterenolgabe (650 γ); *d* nach der 7. Arterenolgabe (200 γ)

Ergebnisse

An allen drei von uns untersuchten Gefäßabschnitten wurden prinzipiell gleiche Ergebnisse erhalten. Die Registrierung der Darmkontraktionen bei den Versuchen am isoliert durchströmten Darm erlaubte uns, Beobachtungen zu machen, die für die Deutung der gesamten Versuche von Bedeutung waren, deshalb werden diese Versuche eingehender behandelt.

Adrenalin (Ad.) und Noradrenalin (Nad.). Injektionen von Ad. oder Nad. in das perfundierte Gefäßsystem des Darmes in Dosen bis zu 500 γ

riefen keine meßbaren Veränderungen am Blutdruck des Hauptkreislaufs hervor. Am isolierten System zeigte sich eine durch Gefäßkonstriktion hervorgerufene Durchflußverminderung.

Acetylcholin (Ach.): Injektionen von 100—300 γ Ach. in das isolierte System führten eine kurzzeitige Blutdrucksteigerung herbei (Abb. 1a), wie bereits von Tschernigowski beschrieben. Diese Wirkung des Ach. nahm im Verlauf des Versuchs ab und war schließlich nach 150 bis 200 min selbst durch 1 mg Ach. kaum noch hervorzurufen. Bei einer geringen Zahl von Versuchen war dieser „*Ach.-Effekt*" von vornherein nur sehr schwach oder ließ sich auch durch hohe Gaben Ach. nicht erzielen.

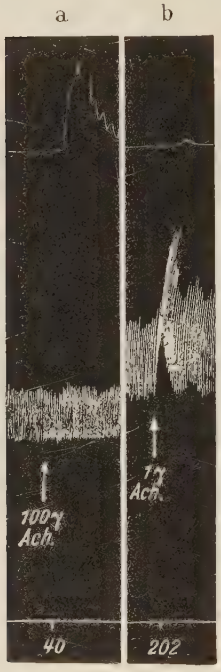


Abb. 2. Isolierter Darm (Versuch X, Katze in Urethannarkose). *a* Ach.-Effekt (100 γ) zu Beginn des Versuchs; *b* Ach.-Effekt (1 γ) nach der 6. Arterenolgabe (500 γ). Obere Linie: Darmkontraktion; untere Linie: Blutdruck

Carbaminoylcholin hatte im Prinzip die gleiche Wirkung wie Ach., die Reaktion war auf gleich hohe Dosen Carbaminoylcholin schwächer, aber länger anhaltend.

Die Wirkung von Ad. und Nad. auf den Ach.-Effekt. Wurden Ad. oder Nad. in Dosen von 50—500 γ vor der Injektion von Ach. in den perfundierten Gefäßabschnitt injiziert, so führten die folgenden Ach.-Gaben zu stärkeren Blutdruckreaktionen als vor der Ad.-Injektion (Abb. 1). Durch Wiederholung dieser Ad.- oder Nad.-Gaben konnten schließlich durch 1 γ Ach. gleiche, vereinzelt sogar stärkere Blutdruckeffekte erzielt werden als anfangs mit 100 γ Ach. (Abb. 1), im Gegensatz zu den Versuchen ohne Ad.- oder Nad.-Gabe, wo im gleichen Zeitraum die Ach.-Effekte sehr stark nachließen oder schließlich sogar ausblieben. Durch Vorbehandlung mit Ad. oder Nad. konnten auch bei solchen Tieren Ach.-Effekte erzielt werden, die anfangs keinen ausgeprägten Ach.-Effekt sehen ließen. Abb. 2 gibt einen solchen Versuch wieder, bei dem zunächst 100 γ Ach. ohne Wirkung blieben, durch mehrmalige Nad.-Gaben wird eine solche Sensibilisierung erreicht, daß 1 γ Ach. eine starke Blutdrucksteigerung hervorruft.

Die Wirkung von Physostigmin und Atropin auf den Ach.-Effekt. 100 γ Physostigmin steigern die Wirkung nachfolgender Ach.-Gaben in das perfundierte System (Abb. 3). Die Wirkungssteigerung war anhaltend, durch 10—25 γ Ach. ließen sich nach 100 γ Physostigmin die

gleichen Blutdruckeffekte erzielen, wie mit 100 γ Ach. vor der Physostigminverabreichung. Wurde Atropin in das perfundierte System gegeben, so kam es zu einer Unterdrückung des Ach.-Effektes (Abb. 4), wobei die Dauer der Atropinwirkung von der Dosis abhängig war. 100 γ hemmten

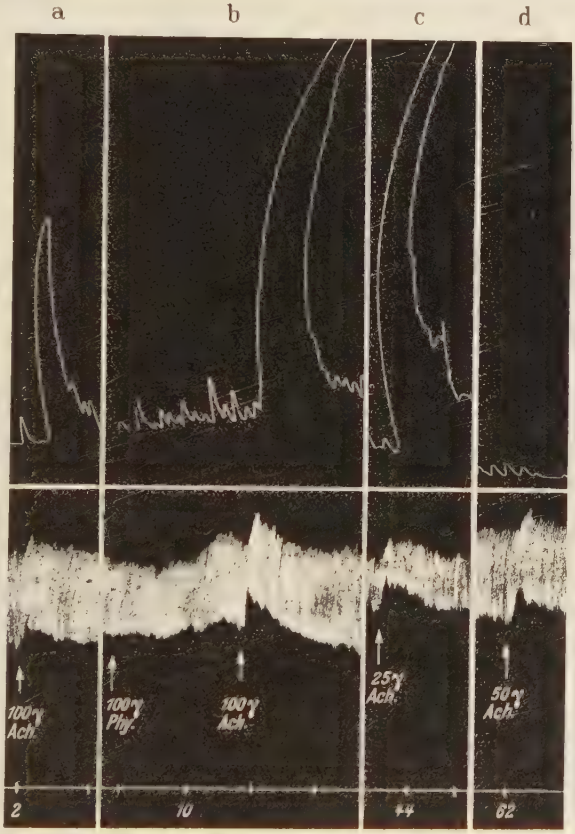


Abb. 3. Isolierter Darm (Versuch XXVII, Katze in Urethannarkose). *a* Ach.-Effekt nach 100 γ Ach. *b* Ach.-Effekt nach 100 γ Ach. 2 min nach 100 γ Physostigmin; *c* Ach.-Effekt mit 25 γ Ach. 35 min nach Physostigmin; *d* Ach.-Effekt mit 50 γ Ach. 5 min nach 100 γ Atropin. sulf. Obere Linie: Darmkontraktion; untere Linie: Blutdruck

nur vorübergehend, 200—300 γ Atropin konnten den Ach.-Effekt für 8—15 min verhindern.

Die Wirkung von Ganglienblockern auf den Ach.-Effekt. Eine Injektion von 10 mg Tetraäthylammoniumbromid (TEAB) in das isolierte System unterdrückte den Ach.-Effekt für 10—15 min, danach war er wieder deutlich zu erkennen, wenn auch zunächst nur mit höheren Dosen Ach. auslösbar als zu Anfang des Versuches (Abb. 5). Die anfängliche Stärke der Blutdruckreaktion ließ sich in der Regel nicht

wieder hervorrufen, ähnlich wie in den Versuchen, in denen Ach. allein gegeben wurde und bei denen es zu einer Wirkungsabnahme des Ach. im Verlauf der Zeit kam.

Pendiomid (N,N,N′,N′,3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-aza-pentylen-diammonium-dibromid) zeigte die gleiche Wirkung, wie TEAB auf den Ach.-Effekt, nur genügten bereits geringere Dosen, 1,5—2 mg, um eine vorübergehende Aufhebung des Ach.-Effektes zu erzielen. Abb. 6 stellt einen Versuch an der isolierten Hinterextremität mit Ach. und Pendiomid dar.

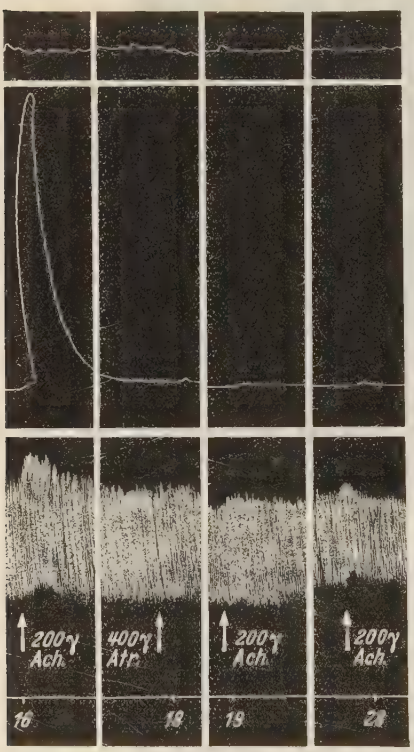


Abb. 4

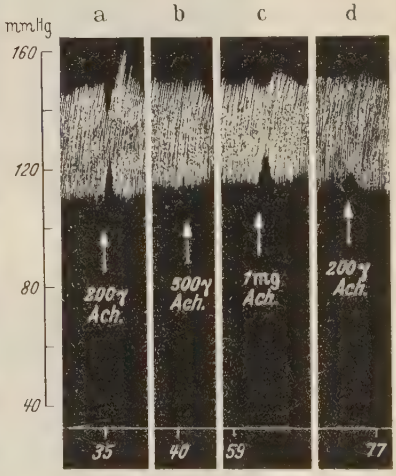


Abb. 5

Abb. 4. Isolierter Darm (Versuch XIX, Katze in Urethannarkose). *a* Ach.-Effekt mit 200 γ Ach.; *b* 400 γ Atropin. sulfur. *c* Ach.-Effekt bleibt aus; *d* Ach.-Effekt 10 min nach 400 γ Atropin. Obere Linie: Kontraktion des nichtisolierten Darmabschnitts; mittlere Linie: Kontraktion des isolierten Darmabschnitts; untere Linie: Blutdruck

Abb. 5. Isolierter Darm (Versuch I, Katze in Urethannarkose).

a Ach.-Effekt (200 γ)
b Ach.-Effekt (500 γ) 3 min
c Ach.-Effekt (1 mg) 22 min } nach 10 mg TEAB, in das isolierte System gegeben
d Ach.-Effekt (200 γ) 40 min

Die Beziehungen zwischen Ach.-Effekt und Darmkontraktion. Ach. ruft nach Gabe in das isolierte System auch eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Darmwand hervor. Eine Sensibilisierung der Darmmuskulatur oder der effectorischen Endorgane für Ach. durch Ad. oder Nad. ließ sich aber nicht nachweisen. Vielmehr war die Wirkung

auf die Darmmuskulatur allein von der Höhe der Ach.-Gabe abhängig, wie aus Abb. 2 eindeutig hervorgeht. Während 100 γ Ach. keine Wirkung auf den Blutdruck hatten, wohl aber eine Kontraktion des Darms verursachten, ließ sich nach der 6. Ad.-Gabe bereits mit 1 γ Ach. eine Blutdrucksteigerung erzielen, die Wirkung auf die Darmmuskulatur ist aber kaum zu erkennen. Physostigmin steigert sowohl die Wirkung des Ach. auf den Darm als auch, wie schon erwähnt, auf den Blutdruck. Nach Verabreichung von Atropin in das perfundierte System ist die direkte Wirkung des Ach. auf den Darm völlig blockiert, diese Hemmung bleibt auch noch bestehen, wenn sich bereits wieder deutliche Ach.-Effekte auf den Hauptkreislauf erzielen lassen (Abb. 4). Die angewandten Ganglienblocker beeinflußten nur unwesentlich die Darmkontraktion durch Ach., auch zu der Zeit, da der Ach.-Effekt auf den Blutdruck vorübergehend gehemmt war.

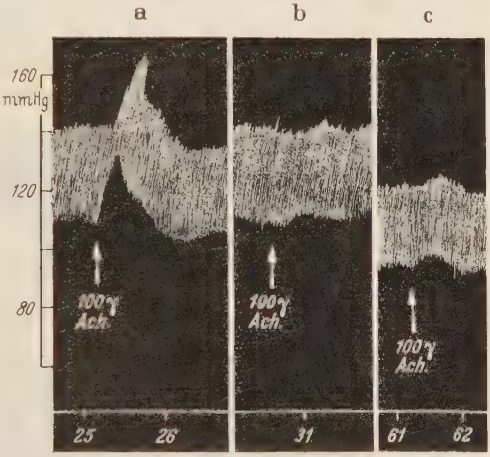


Abb. 6.
Hinterextremität (Versuch XIII, Katze in Urethannarkose).
a Ach.-Effekt (100 γ)
b Ach.-Effekt (100 γ) 2 min } nach 2 mg Pendiomid, in
c Ach.-Effekt (100 γ) 32 min } das isolierte System gegeben

Die Injektionen von Ach. und der übrigen angewandten Substanzen in das isolierte System blieben ohne Einfluß auf die Motilität des Darmabschnitts, der in Verbindung mit dem Hauptkreislauf belassen wurde.

Die Wirkung von Propaphenin* (p-Dimethylaminopropyl)-2-Chlorophenothiazin auf den Ach.-Effekt. 100–500 γ Propaphenin führten nach Injektion in das isolierte System zu einer Abschwächung oder Aufhebung der Ach.-Effekte für 10–20 min, dabei konnte bei Anwendung der höheren Dosen die Wirkung auch von 1–2,5 mg Ach. auf den Blutdruck verhindert werden (Abb. 7). Nach Abklingen der Propaphenin-Wirkung konnten in der Regel die gleichen Ach.-Effekte wie vor der Hemmung erzielt werden.

Die Wirkung der Adrenalektomie und der intravenösen Gabe von Regitin und Megaphen. Nach beiderseitiger Adrenalektomie ist der

* Propaphenin entspricht chemisch dem Megaphen.

Ach.-Effekt zwar leicht vermindert, aber nicht aufgehoben. Wurde dem adrenalektomierten Tier 0,5 mg Regitin in den Hauptkreislauf injiziert, so kam es zur völligen Aufhebung des Ach.-Effektes (Abb. 8). In der angewandten Dosierung hielt diese Hemmung durch Regitin aber nur 15—20 min an. Eine ähnliche Wirkung hatte auch die intravenöse Gabe von 2,5 mg Propaphenin (Abb. 7). Diese Propapheninwirkung auf den Ach.-Effekt trat in ihrer vollen Stärke erst nach etwa 10 min ein.

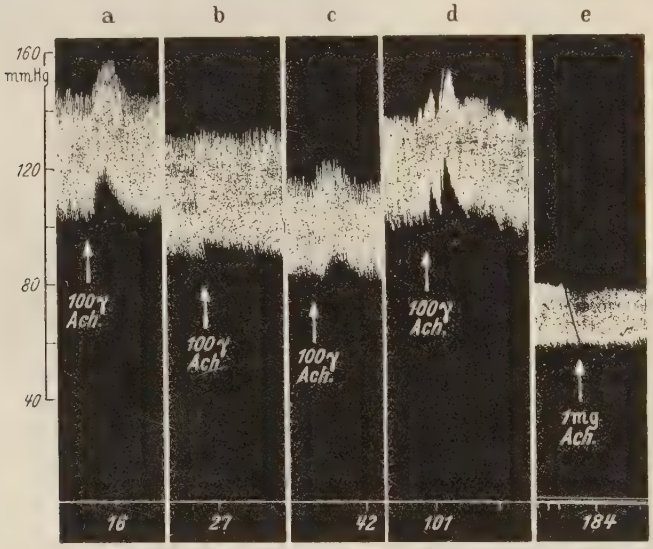


Abb. 7. Isolierter Darm (Versuch III, Katze in Urethannarkose).

a Ach.-Effekt (100 γ)
b Ach.-Effekt (100 γ) 8 min
c Ach.-Effekt (100 γ) 23 min } nach 100 γ Propaphenin in das isolierte System gegeben
d Ach.-Effekt (100 γ) 101 min
e Ach.-Effekt (1 mg), 80 min nach 2,5 mg Propaphenin i. v.

Diskussion

Bei der noch ungeklärten Natur der Ach.-empfindlichen intero-receptiven Endorgane nahmen wir zunächst an, daß mit ähnlichen Ach.-Wirkungen zu rechnen ist, wie sie bei den Ach.-empfindlichen Effectoren schon länger bekannt sind. Am einfachsten war die Wirkung des Physostigmins als Anticholinesterase zu verstehen, denn auch unter den Bedingungen unserer Versuche mußte eine verzögerte enzymatische Hydrolyse des Ach. eine Wirkungssteigerung dieser Substanz hervorrufen. Auch die Hemmung des Ach.-Effekts durch Atropin überraschte nicht, wenn es auch von vornherein nicht sicher war, daß der Mechanismus der Ach.-Wirkung an den Receptoren der gleiche sein mußte, wie an den Ach.-empfindlichen Effectoren. Die unterschiedlichen Wirkungen

des Atropins auf die Muskulatur der Darmwand und auf die Interoreceptoren bei Reizung durch Ach. in bezug auf Dauer und Intensität deuten auch darauf hin, daß gewisse qualitative Unterschiede bestehen, die noch aufzuklären sind.

Der Blutdruck-Effekt des Ach. wird nicht durch die Kontraktion der glattmuskulären Elemente der Darmwand hervorgerufen, sondern offensichtlich durch seine Wirkung auf spezifische Chemoreceptoren. Es war möglich, Ach.-Effekte während der völligen Lähmung der glatten Muskulatur der Darmwand durch Atropin zu erzielen. Ferner erlaubte die Sensibilisierung durch Adrenalin die Anwendung von so niedrigen Dosen Ach. zur Erzielung des Ach.-Effektes, wie sie zur Darmkontraktion niemals ausreichten (Abb. 2). Andererseits waren die Darmkontraktionen durch Ach. nach Pendiomid nur unbedeutend vermindert, während der Ach.-Effekt am Blutdruck völlig unterdrückt war. Es interessierte uns aber vor allem die Sensibilisierung für Ach. durch Adrenalin oder Noradrenalin.

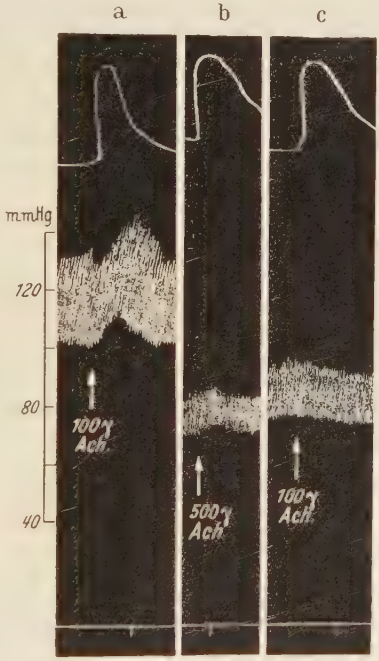


Abb. 8. Isolierter Darm (Versuch XVII, Katze in Urethannarkose). *a* Ach.-Effekt nach beiderseitiger Adrenalektomie; *b* 6 min nach 0,5 mg Regitin i.v.; *c* 10 min nach 0,5 mg i.v. Obere Linie: Darmkontraktion; untere Linie: Blutdruck

Seit vor nunmehr über dreißig Jahren Orbeli auf die ermüdungsbeseitigende Wirkung von Adrenalin auf die quergestreifte Muskulatur hingewiesen hatte, sind eine Reihe von Arbeiten erschienen, die auf ähnliche Zusammenhänge zwischen der Ach.- und Adrenalinwirkung hinweisen. Bülbring (2) kam zu gleichen Ergebnissen, spätere Untersuchungen von Goffart u. Brown sowie von Brown, Bülbring u. Burns erbrachten das Ergebnis, daß der Angriff des Adrenalins wohl mehr an der contractilen Substanz der quergestreiften Muskulatur zu suchen sei. Allerdings wiesen Rosenblueth, Lindsley u. Morison schon nach, daß auch eine decurarisierende Wirkung des Adrenalins an der myoneuralen Synapse der quergestreiften Muskulatur besteht. Brown, Goffart u. Vianna Dias konnten eine Steigerung der Muskelspannung auf elektrische Stimulation durch intraarterielle Injektion von 0,5 bis 20 γ Adrenalin hervorrufen. Die erzielten Effekte waren unabhängig von der muskulären Ermüdung, ließen sich auch durch Noradrenalin und Isopropylnoradrenalin hervorrufen und waren durch Sympathicolytica nicht hemmbar. Reizung des Sympathicus an Stelle der Adrenalin-Injektion führte zu ähnlichen Effekten.

Dieser Erleichterung der Erregungsübertragung an der myoneuralen Synapse der quergestreiften Muskulatur entsprechen Befunde, die an der vegetativen ganglionären Synapse erhoben wurden. So konnte Marazzi (1) zunächst nur eine Verminderung der postganglionären Aktionspotentiale nach präganglionärer elektrischer Stimulation bei Perfusion des Ganglions mit Adrenalin feststellen, sowohl bei hohen, als auch bei niederen Dosen.

Später fand er eine Hemmung der Erregungsübertragung nur bei höheren Dosen, niedere Dosen hingegen führten zu einer Förderung der Transmission [Marazzi, (2)]. Bülbring (1) bestätigte diese Befunde. Sie schloß dabei an eine Arbeit von Bülbring u. Burn an. Dort konnten die Autoren zeigen, daß bei isolierter

Tabelle 1. *Wirkungen verschiedener Pharmaka auf den „Ach.-Effekt"*

Substanz:	Injektionsart	Sensibilisierung	Hemmung
Adrenalin	isoliertes System	++	—
l-Noradrenalin	„ „	++	—
Physostigmin	„ „	+	—
Atropin	„ „	—	+
TEAB	„ „	—	++
Pendiomid	„ „	—	++
Propaphenin	„ „	—	+
Propaphenin	Hauptkreislauf	—	+
Regitin	„ „	—	+++
Adrenalektomie		—	(+)

Perfusion des lumbalen Sympathicusanteils und einer Hinterextremität die Adrenalinwirkung auf die Gefäße der Hinterextremität durch Gabe von Adrenalin in das *isoliert durchströmte Ganglion* gesteigert werden kann. Sehr hohe Dosen Adrenalin *im perfundierten Ganglion* hemmten dagegen die Adrenalinwirkung in der Extremität. Lundberg konnte nach 1 γ Adrenalin eine Hemmung der Einzelimpulse an der ganglionären Synapse registrieren, Noradrenalin hatte nur ein Viertel der Wirkung. Die vollständige Hemmung der Übertragung durch Adrenalin führt nach Lundberg zur Bildung eines synaptischen Potentials, wodurch ein zweiter Reiz eine starke Fazilitation erfahren würde. Die Übertragungshemmung durch Adrenalin ließ sich durch Dihydroergotamin stark reduzieren. Kürzlich haben Kewitz u. Reinert die Wirkung verschiedener Sympathicomimetica auf die chemisch und elektrisch ausgelöste Erregung der postganglionären Faser untersucht und dabei festgestellt, daß Adrenalin und Noradrenalin die durch Ach. an der Synapse ausgelöste Erregung fördern, hingegen die durch präganglionäre Reizung hervorgerufene hemmen. Daß das Adrenalin nicht nur eine Bedeutung als Sympathicomimeticum besitzt, sondern daß ihm auch noch andere Funktionen im Nervensystem zukommen, geht unter anderem auch aus einer Mitteilung von Blasius u. Thron hervor, nach der dieser Stoff die Erholung der Vorderhornganglienzellen nach Ischämie verkürzt.

Wenn man die bisher vorliegenden Befunde zu ordnen versucht, so ergibt sich, daß noch keine Klarheit über die Bedeutung des Adrenalins für die Wirkung des Ach. besteht. Eines scheint sich aber aus alledem

ableiten zu lassen: Offensichtlich ist bei dem Vorliegen einer Sensibilisierung für Ach. durch Adrenalin an das Vorhandensein einer ganglionären Synapse oder eines ähnlichen nervalen Elements zu denken. Das sind auch die vorläufigen Schlußfolgerungen, die wir aus dem ähnlichen Effekt bei unseren Versuchen an den isoliert durchströmten Organen ziehen möchten.

Wir waren auf Grund dieser Versuche geneigt, auch für die von uns untersuchten Receptorenfelder das Vorhandensein von ganglionären Elementen anzunehmen. Diese Annahme stieß bei der Deutung der Versuchsergebnisse am isolierten Darm auf keine größeren Schwierigkeiten, die Tatsache der intramuralen Ganglienplexus ist ja allgemein bekannt. Im Bereich der isolierten Hinterextremität sind aber ganglionäre Elemente nach allem, was darüber bekannt ist, viel unwahrscheinlicher als an den inneren Organen.

Anküpfend an die klassischen Versuche von Dale über *die Umkehr der Ach.-Wirkung auf die peripheren Gefäße durch Atropin* zeigte Kottegoda (1, 2), daß die nach Atropinisierung erzielbare Gefäßverengerung am Kaninchenohr auch durch Nicotin hervorgerufen werden kann, und daß diese Umkehr durch Ganglienblocker aufhebbar ist. Bei längerer Durchströmung des Ohres kommt es zu dieser Umkehr auch ohne Atropinisierung, die Entfernung der Haut des Ohrs führt aber bei den verbleibenden Knorpelgefäßen wieder zu dem reinen Bild der Gefäßerweiterung durch Ach. Der Autor schließt daraus, daß die Hautgefäße des Ohrs ganglionäre Elemente enthalten. Es wäre also denkbar, daß auch in anderen Gefäßgebieten und bei anderen Tierarten derartige periphere ganglionäre Systeme vorkommen. Auch in unserer Versuchsanordnung konnte die Wirkung des Ach. durch Ganglienblocker unterdrückt werden, und zwar sowohl am isoliert durchströmten Darm, als auch an der isolierten Hinterextremität.

De Castro konnte in seinen histologischen Bildern der Chemoreceptoren des Carotissinus synapsenähnliche Strukturen nachweisen. Die Berücksichtigung dieser Befunde würde bedeuten, daß die Annahme besonderer ganglionärer Elemente nicht notwendig ist, sondern daß die Chemoreceptoren selbst die von uns vermuteten synaptischen Übergangsstellen enthalten. Unter einer solchen Annahme lassen sich unsere Befunde einordnen in die Beobachtungen, die bisher an vegetativen ganglionären Synapsen und an den myoneuralen Synapsen gemacht wurden. Auch die Wirkung des in den isolierten Gefäßabschnitt gegebenen Propaphenins das eine Hemmung der Ach.-Effektes verursachte, wird dann im Zusammenhang mit den Beobachtungen von Budde (1, 3) verständlich, der durch 150 bis 500 γ Propaphenin die Ach.-Wirkung am isoliert durchströmten Ganglion cervicale aufheben konnte, ebenso konnte die synaptische Transmission präganglionärer Reizung gehemmt werden, während die postganglionäre Reizung unbeeinflußt blieb. Möglicherweise spielt dabei die lokalanaesthetische Wirkung des Propaphenin eine Rolle (siehe auch Kalkoff).

Was die eigentliche reflektorische Reaktion betrifft, die wir gewissermaßen als Indicator für die Veränderungen am Receptorenfeld benutzen, so läuft sie, (wofür auch die Hemmung des Ach.-Effektes durch intravenöse Regitingabe sprechen würde), in ihrem effectorischen Abschnitt offensichtlich über den Sympathicus. Wie die unbedeutende Wirkung

der Adrenalektomie auf den Ablauf der Reaktion zeigt, spielt dabei wohl nicht so sehr ein humoraler Weg als vielmehr derjenige über die constrictorischen Gefäßnerven eine Rolle.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Budde, Donat u. Witzleb (2) die Ach.-Erregung im Nervus saphenus-Gebiet und am Carotissinus durch TEAB hemmen. Hingegen besteht noch ein Widerspruch zu den Arbeiten von Mietkiewski. Er untersuchte die Wirkung von Ach. auf den Blutdruck nach Gabe in das isoliert durchströmte Kaninchenohr und beobachtete in allen Fällen nur Blutdrucksenkungen, die aber durch vorhergehende Durchspülung des isolierten Gefäßabschnittes mit Atropin verhindert werden konnten. Möglicherweise liegen in diesem Teil des Gefäßsystems besondere Verhältnisse vor, vielleicht bestehen aber auch Unterschiede von Tierart zu Tierart.

Auf Grund der bisherigen Untersuchungen synaptischer Elemente des Nervensystems können unsere Befunde am besten durch das Vorhandensein von Synapsen im Receptorenfeld erklärt werden.

Zusammenfassung

1. Acetylcholin führt nach Injektion in das isoliert perfundierte Gefäßsystem des Darms, der Milz und der Hinterextremität der Katze zu einem Blutdruckanstieg im Hauptkreislauf (Ach.-Effekt).

2. Adrenalin und Noradrenalin führen zu einer Sensibilisierung der Chemoreceptoren des isolierten Gefäßsystems für Acetylcholin. Ihre Empfindlichkeit kann etwa 100fach gesteigert werden.

3. Die Ganglienblocker TEAB und Pendiomid können nach Injektion in das isolierte System den Ach.-Effekt unterdrücken.

4. Atropin und Propaphenin führen nach Injektion in das isolierte System zu einer vorübergehenden Hemmung des Ach.-Effekts.

5. Beidseitige Adrenalektomie ist ohne Einfluß auf den Ablauf der reflektorischen Reaktion; Regitin vermag nach Injektion in den Hauptkreislauf ihr Zustandekommen zu verhindern.

6. Zur Deutung dieser Befunde wird das Vorhandensein synaptischer Elemente in den Chemoreceptoren angenommen.

Literatur

Blasius, W., and H. L. Thron: J. of Biol. **107**, 161 (1954). — Brown, G. L., E. Bülbring and B. D. Burns: J. of Physiol. **107**, 115 (1948). — Brown, G. L., M. Goffart and M. Vianna Dias: J. of Physiol. **111**, 184 (1950). — (1) Budde, H.: Arch. internat. Pharmacodynamie **97**, 141 (1954). — (2) Budde, H., K. Donat et E. Witzleb: Arch. internat. Pharmacodynamie **100**, 479 (1955). — (3) Budde, H., et E. Witzleb: Arch. internat. Pharmacodynamie **102**, 126 (1955). — Bülbring, E., and J. H. Burn: J. of Physiol. **101**, 224 (1942). — (1) Bülbring, E.: J. of Physiol. **103**, 55 (1944); (2) Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — Castro, F. de: Acta physiol. scand. (Stockh.) **22**, 14 (1951). — Dale, H. H.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **6**, 147 (1914). — Goffart, M., et G. L. Brown: C. r. Soc. Biol. (Paris) **141**, 958

(1947). — Hering, E., u. J. Breuer: Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Abt. 2, **58**, 909 (1868). — Heymans, C., et L. Daudrebande: Arch. internat. Pharmacodynamie **39**, 400 (1930). — Heymans, C.: Arch. internat. Pharmacodynamie **40**, 54 (1931). — Kalkoff, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 92 (1955). — Kewitz, H., u. H. Reinert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 311 (1954). — (1) Kottegoda, S. R.: J. Brit. Pharmacol. **8**, 83 (1953); (2) **8**, 156 (1953). — Lundberg, A.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **26**, 252 (1952). — (1) Marazzi, A. S.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **65**, 395 (1938); (2) Amer. J. Physiol. **127**, 738 (1939). — Mietkiewski, E.: Arch. internat. Pharmacodynamie **104**, 373 (1956). — Orbeli, L. A.: Sammelband, gewidmet zum 75. Geburtstag des Akademiemitgliedes I. P. Pawlow, Leningrad **1924**. 403. — Rosenblueth, A., D. B. Lindsley and R. S. Morison: Amer. J. Physiol. **115**, 53 (1936). — Traube, W.: Allgem. med. Zentral-Ztg. **1863**, 769, 776. — (1) Tschernigowski, W. N.: Physiol. J. UdSSR. **29**, 3 (1940); (2) **29**, 15 (1940); (3) **29**, 526 (1940).

Dr. H. Matthies, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität. Berlin NW 7, Clara-Zetkin-Str. 94

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 556—567 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. L. Lendle)

Das Verhalten der Körperstellreflexe bei der Steroidnarkose im Vergleich zur Evipan- und Inactinnarkose

Von
K.-W. von Eickstedt* und K.-P. Schaefer

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. September 1956)

Eine Reihe von Steroidhormonen besitzt neben ihrer spezifischen Hormonwirkung auch noch in großen Dosen eine anaesthetische Eigenschaft, wie H. Selye 1940 in Tierversuchen feststellte. Dies war für längere Zeit nur von theoretischer Bedeutung, bis Merryman, Boiman, Barnes u. Rothchild mit einem Steroid auch beim Menschen ähnliche Wirkungen hervorrufen konnten. Sie verwandten Progesteron, welches zu den Steroiden mit ausgeprägter anaesthetischer Wirkung gehört (Selye, 1942), aber wegen seiner Hormonwirkungen ebenso wie die Mehrzahl der anderen Steroide für eine klinische Anwendung als Anaestheticum nicht in Frage kommt.

Laubach, P'an u. Rudel fanden kürzlich in Tierversuchen unter den Steroiden das *21-Hydroxypregnan-3,20-dion*, welches einerseits als Katabolit des Desoxycorticosterons hormonal unwirksam ist, andererseits aber in seiner anaesthetischen Wirkung die bisher bekannten Steroide übertrifft. Diese Eigenschaft verdankt es außerdem der Tatsache, daß es von den genannten Untersuchern als Natriumsuccinat angewendet wurde, welches im Gegensatz zu den reinen Steroiden gut wasserlöslich ist und somit schneller resorbiert wird.

Das Hydroxypregnandionsuccinat („Hydroxydion") fand bereits klinische Anwendung als Basisnarkoticum (P. Gaudin u. G. Hossli; Gordan, Guardagni, Picchi u. Adams; Howland, Boyan u. Wang; Just u. Ibe; Murphy, Guardagni u. De Bon; Taylor u. Shearer; siehe auch bei v. Eickstedt). Im Hinblick auf seine pharmakologischen Eigenschaften wurden bereits die ersten Untersuchungen von P'an, Gardocki, Hutcheon, Rudel, Kodet u. Laubach vorgenommen. Sie beobachteten in Tierversuchen eine große therapeutische Breite und das Fehlen schädlicher Nebenwirkungen bei diesem Narkoticum, welches sie mit dem Thiobarbiturat Pentothal verglichen.

Wie bereits O. Girndt feststellte, wird der relative Wirkungswert eines Schlafmittels weitgehend von der Narkosetiefe bestimmt, bei welcher

* Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

man es untersucht. Prüft man also die Wirkung eines Schlafmittels allein mit Hilfe des Ausfalles eines Reflexes wie z. B. des Cornealreflexes oder nur an Hand der in einer bestimmten Narkosetiefe erfolgenden Seitenlage, so werden leichtere hypnotische Effekte, wie sie gerade MERRYMAN, BOIMAN, BARNES u. ROTHCHILD in einigen Fällen bei Progesteron beobachteten, nicht miterfaßt. Für die Prüfung eines Narkosemittels im Tierversuch sind die Halte- und Stellreflexe nach MAGNUS besonders geeignet, da sie gegenüber Narkotica verschieden resistent sind. An Hand der Reihenfolge ihres Ausfalls läßt sich die Narkosetiefe in jedem Zeitabschnitt bestimmen und in Stadien einteilen (SCHOEN; GIRNDT). Dementsprechend wurden in eigenen Tierversuchen bei verschiedener Dosierung die Halte- und Stellreflexe nach MAGNUS sowie die Aufsetzreflexe nach RADEMAKER geprüft. Zur Abgrenzung gegen andere Kurznarkotica wurden vergleichende Untersuchungen mit den beiden gebräuchlichsten dieser Art, dem Evipan (N-Methyl-C-Methyl-C-Cyclohexenyl-Barbitursäure als Na-Salz) und dem Inactin (Äthyl-l-Methyl-Propyl-Thiobarbitursäure) durchgeführt.

Methodik

Als Versuchstiere kamen Meerschweinchen (300—500 g), Kaninchen (2 bis 2,5 kg) und Katzen (2—3 kg) zur Verwendung. Von allen 3 Tierarten wurden etwa die gleiche Anzahl männlichen und weiblichen Geschlechts für jede Versuchsgruppe benutzt, um mögliche geschlechts-spezifische Unterschiede bei dem Steroidanaestheticum miterfassen zu können. Die Narkotica Hydroxydion[1], Evipan und Inaktin wurden in gleichen Konzentrationen von 2—4 mal 10^{-2} den Meerschweinchen und Katzen intraperitoneal, den Kaninchen intraperitoneal und intravenös injiziert. Das Verschwinden und Wiederauftreten der Reflexe wurde bei steigender Dosierung der genannten Substanzen zeitlich festgelegt. Geprüft wurden die Halte- und Stellreflexe, so wie sie von MAGNUS beschrieben und in vergleichenden Untersuchungen an Narkotica von SCHOEN, GIRNDT u. a. angewendet wurden. Betrachtet wurde hierbei besonders die Einteilung der Reflexe in Labyrinthstellreflexe, Progressivreaktionen, Drehreaktionen und Körperstellreflexe. Quantitative Vergleiche der Narkotica an Hand dieser Reflexe, welche im Mittelhirn und der Medulla oblongata lokalisiert sind (MAGNUS), wurden hierbei vorwiegend an Meerschweinchen vorgenommen. Um Großhirnwirkungen miterfassen zu können, wurden an Katzen zusätzlich noch die Aufsetzreflexe nach RADEMAKER (siehe auch bei SCHAEFER) nach intraperitonealer Injektion der 3 Substanzen geprüft. Wirkungsunterschiede zwischen intraperitonealer und intravenöser Injektion wurden an Kaninchen geprüft und damit Vergleichsmöglichkeiten mit den Ergebnissen früherer Untersucher geschaffen, welche diese Tierart für Stellreflexuntersuchungen häufig verwendeten.

Ergebnisse

In Versuchen an *Meerschweinchen* wurde zunächst die Reihenfolge des Stellreflexausfalls unter der Einwirkung von Hydroxypregnandion festgestellt. Die Lähmung dieser Reflexe erfolgte hierbei in einer regelmäßigen

[1] „Praesuren" der Firma Schering, welcher wir für das zur Verfügung gestellte Material danken.

und reproduzierbaren Reihenfolge. Bereits bei 10 mg pro kg i.p. zeigte das Hydroxydion eine deutliche Wirkung auf die Stellreflexe. Als erstes Zeichen der beginnenden narkotischen Lähmung fiel der Zehenspreizreflex aus, eine bei Meerschweinchen typische Progressivreaktion. Bei etwas höherer Dosierung (15—20 mg pro kg i.p.) folgte der Ausfall des Körperstellreflexes auf den Körper. Als nächster wurde bei etwa 30 mg/kg i.p. der Halsstellreflex auf den Körper gelähmt. Kopf und Körper der Tiere konnten ohne tonischen Widerstand gegeneinander gedreht werden. In diesem Narkosestadium war auch bereits der Labyrinthstellreflex auf den Kopf deutlich gehemmt. Eine völlige Lähmung dieses Reflexes erfolgte erst nach dem Wegfall des Drehnachnystagmus des Kopfes sowie seines Drehnystagmus.

Der Ausfall der genannten Stellreflexe machte sich auch im Allgemeinverhalten der Tiere bereits deutlich bemerkbar. Sie saßen in Bauchlage und waren beim Laufen und Springen ausgesprochen ataktisch. Der recht komplizierte Fallumdrehreflex, der sich bekanntlich aus mehreren Stellreflexen, wie dem Labyrinthstellreflex auf den Kopf und dem Halsstellreflex auf den Körper zusammensetzt, war besonders stark beeinträchtigt.

In dem nun folgenden Narkosestadium wurden sowohl der Körperstellreflex auf den Kopf als auch die Bereitschaft zum Sprung erheblich beeinträchtigt. Damit war jetzt das Seitenlagestadium erreicht, da diejenigen Reflexe, welche beim Spontanaufrichten beteiligt sind und die aufrechte Haltung ermöglichen, nicht mehr vorhanden waren. Dieser Zustand wurde mit 40—60 mg/kg i.p. Hydroxypregnandion erreicht.

Bei 60—80 mg/kg kamen darüber hinaus der Dreh- und Drehnachnystagmus der Augen zum Erliegen. Die Dreh- und Drehnachreaktionen des Kopfes und der Augen erwiesen sich dagegen als deutlich widerstandsfähiger. Das längere Erhaltenbleiben dieser Reaktionen beim Ablauf der Narkose wurde auch bei anderen Stoffen wie dem bereits erwähnten Luminal (Phenyl-äthyl-barbitursäure) beschrieben. Im Gegensatz hierzu versagte bei der gleichen Dosis schon die Reaktion der Pupille auf Licht und das zu den kompensatorischen Augenstellungen gehörige Augenrollen. Um weitere Reflexe wie den Preyerschen Ohrreflex, die vertikale Augendeviation, den Cornealreflex sowie die durch Kneifen der Pfoten ausgelösten Rückenmarksreflexe zu lähmen, waren noch größere Mengen des Steroids erforderlich (mehr als 100 mg/kg i.p.). Selbst bei diesen Dosen blieben die Atmungs- und Kreislauffunktionen, soweit sie durch Beobachtung der Haut und Schleimhäute sowie durch Auskultation und Palpation des Herzens beurteilt werden konnten, nahezu unbeeinträchtigt. Erst bei 180 bis 200 mg/kg i.p. trat der Tod durch Atemlähmung ein.

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen mit Evipan und Inactin zeigten, daß diese beiden Narkotica die Stellreflexe in nahezu gleicher Reihenfolge zum Ausfall brachten wie Hydroxypregnandion. Diese Gleichartigkeit des Wirkungsablaufes machte es möglich, mit Hilfe des Ausfalls der Stellreflexe Dosiswirkungskurven der drei genannten Substanzen zu ermitteln.

In Abb. 1 sind diese Dosiswirkungskurven für die drei Substanzen dargestellt. Auf der Abszisse sind die verwendeten Substanzmengen in mg/kg aufgetragen. In Richtung der Ordinate sind die Stellreflexe in der für die drei Narkotica typischen

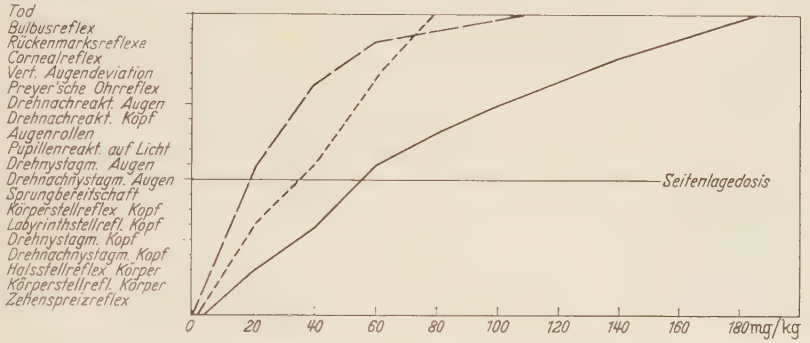


Abb. 1. Dosiswirkungskurve (i.p. Injektion bei Meerschweinchen);
— — — Evipan; - - - - - - Inactin; ———— Hydroxypregnandion

Reihenfolge von unten nach oben, also in Richtung zunehmender Narkosetiefe, aufgeführt. Ob die Reihenfolge des Ausfalls dieser Reflexe einem linearen Verlauf der Narkosetiefe entspricht, läßt sich hierbei nicht entscheiden. Jeder der angegebenen Werte wurde mit 6 Versuchen belegt.

Der Verlauf der einzelnen in Abb. 1 gezeigten Kurven läßt erkennen, daß gleiche Dosen des Steroids, des Hexobarbitals und des Thiobarbitals in den einzelnen Narkosestadien ein verschiedenes Wirkungsverhältnis zeigen. Während Hydroxydion und Inactin in niedrigen Dosen noch eine annähernd gleiche Wirkungsstärke besitzen, macht sich der steilere Wirkungsanstieg des Inactins oberhalb der „Seitenlagedosis" zunehmend bemerkbar. Das Thiobarbiturat führt bereits bei der Mehrzahl der Tiere mit 80 mg/kg zum Tode, beim Hydroxydion tritt die tödliche Wirkung erst im Bereich von 180 –200 mg/kg ein. Wieder anders verhält sich das Evipan, welches bei niedriger Dosierung stärkere Wirkungen als das Inactin aufweist, jedoch erst bei 110—120 mg/kg tödlich wirkt. Außerdem ist im einzelnen aus der Abb. 1 zu ersehen, daß das Seitenlagestadium mit Evipan bei etwa 30 mg/kg erreicht wird, mit Inactin bei 40 mg/kg und bei dem Hydroxypregnandion erst mit etwa 60 mg/kg. In diesem Stadium sind sensible Reaktionen wie der Cornealreflex, der Preyersche Ohrreflex und die Beinbewegungen nach Pfotenkneifen noch deutlich

vorhanden. Der Ausfall dieser Reaktionen erfolgt erst in einem sehr viel tieferen Narkosezustand, welcher mit 60 mg/kg Evipan, 60—80 mg/kg Inaktin und etwa 160 mg/kg Hydroxydion erreicht wird.

Für einen qualitativen Vergleich wurden noch die anaesthetischen Wirkungen hoher Dosen von Desoxycorticosteron und Cortison auf die Stellreflexe geprüft. Zur Verwendung kamen Desoxycorticosteron in öliger Lösung (Percorten, Ciba), Desoxycorticosteron als wasserlösliches Glucosid (Cortiron-Glucosid, Schering) und Cortison als Mikrokristallsuspension (Incortin, Merck), welche Meerschweinchen i.p. injiziert wurden. Die Wirkungen dieser Steroide waren deutlich geringer als die des Hydroxypregnandionsuccinats. Erst in toxischer Dosierung konnte das Seitenlagestadium erreicht werden. Bei der deutlich feststellbaren Wirkung auf die früh-

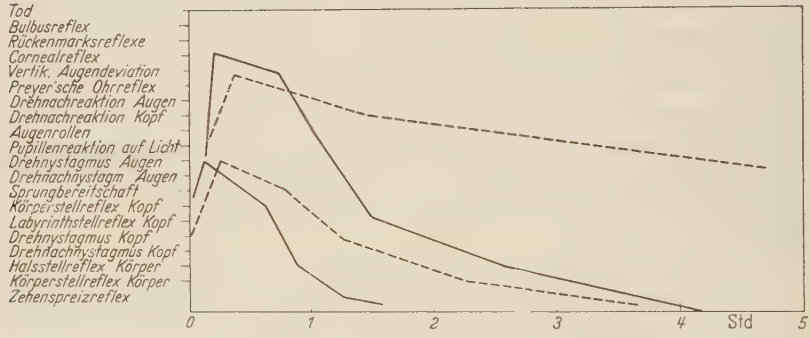


Abb. 2. Dosiszeitkurve einer mittleren und höheren Dosis (Meerschweinchen i.p.); - - - - Inactin 40 mg/kg (unten) und 60 mg/kg (oben); —— Hydroxypregnandion 60 mg/kg (unten) und 140 mg/kg (oben)

zeitig ausfallenden Stellreflexe war es auffällig, daß die Ausfälle in der gleichen Reihenfolge wie bei Hydroxypregnandion stattfanden. Mit 40—60 mg/kg des Desoxycorticosteron-Glucosids konnten der Zehenspreizreflex und der Körperstellreflex auf den Körper gelähmt werden. Der Halsstellreflex auf den Körper und der Labyrinthstellreflex auf den Kopf waren in diesen Versuchen beeinträchtigt. Die Tiere saßen in Bauchlage und der Fallumdrehreflex wurde nicht mehr korrekt ausgeführt. Nach Injektion der öligen Lösung konnte eine etwa gleich starke Wirkung auf die Stellreflexe beobachtet werden. Das Wirkungsmaximum wurde im Gegensatz zur wäßrigen Lösung des Desoxycorticosterons jedoch erst 1 Std später erreicht. Mit 80 mg/kg Desoxycorticosteron gelang es in der Hälfte der Versuche das Seitenlagestadium zu erreichen. Mit Cortison konnten nur bei höherer Dosierung Stellreflexlähmungen beobachtet werden; das Seitenlagestadium wurde nur in einem Fall mit etwa 100 mg/kg erreicht. Die Versuche mit den genannten Corticoiden führten in einer Dosis, welche das Seitenlagestadium bewirkte, bei mehr als der Hälfte der Versuchstiere zum Teil noch nach mehreren Tagen zum Tode.

Nachdem die für die einzelnen Narkosestadien (Abb. 1) erforderlichen Mengen der drei Narkotica ermittelt waren, ließen sich auch die „äquieffektiven" Dosen dieser Substanzen in ihrem *zeitlichen Wirkungsverlauf* miteinander vergleichen. Hierbei fiel zunächst auf, daß die Narkosedauer

des Steroids bei steigender Dosierung nicht stark zunahm. Bei 20 mg/kg i.p. dauerte die Narkose bis zur Wiederkehr des Zehenspreizreflexes ungefähr 1 Std, bei der fünffachen Dosis nicht länger als 2—3 Std und bei 180 mg/kg i.p., einer also nahezu tödlichen Dosis, im Höchstfall 4—5 Std. Deutlich war in allen Versuchen der schnelle Abfall der Gipfelwirkung des Steroids, welche bei 140—180 mg/kg i.p. bei leichtem Absinken nicht ganz 1 Std anhielt, um dann schnell das Seitenlagestadium zu unterschreiten.

Evipan hatte im Bereich niederer Dosen bei gleicher Narkosetiefe eine annähernd gleiche Wirkungsdauer wie das Steroid, oberhalb der Seitenlagedosis jedoch eine etwas längere Narkosezeit. Wieder anders verhielt sich das Inactin, welches auch im Bereich flacher Narkosestadien eine etwas länger anhaltende Wirkung besaß als das Hydroxydion, in höheren Dosen dagegen eine ausgesprochen verlängerte Narkosezeit erkennen ließ. Während 40 mg/kg Incatin eine durchschnittlich 3½stündige Narkose bewirkten, war bei 60 mg/kg der Zehenspreizreflex für mehr als 10 Std gelähmt.

Für die Abb. 2 wurden die für ein niedriges und ein hohes Narkosestadium in Frage kommenden äquieffektiven Dosen von zwei der Narkotica ausgewählt. Zu erkennen ist der steile Wirkungsanstieg von Hydroxydion, welcher weitgehend dem des Evipans gleicht, während Inaktin die maximale Narkosetiefe erst einige Minuten später erreicht.

Bei diesen Versuchen fiel auf, daß ein Teil der mit dem Steroid behandelten Tiere auch nach Wiederkehr der geprüften Stellreflexe noch für längere Zeit geringgradig ataktisch war. Um leichtere hypnotische Effekte, welche in der üblichen Weise mit den Stellreflexen nicht mehr erfaßbar sind, nachweisen zu können, wurde nach dem Abklingen der Narkose, welches am Wiederauftreten des Zehenspreizreflexes erkennbar war, am gleichen Tier eine kleinere Dosis eines der anderen Narkotica geprüft. Bei einer noch vorhandenen latenten Nachwirkung des Steroids war mit einer Verstärkung der bereits bekannten Wirkung der Barbituratdosis zu rechnen.

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, besitzt das Hydroxypregnandion nach Wiederkehr des empfindlichsten der Stellreflexe noch eine deutlich verstärkende Wirkung auf das geprüfte Barbiturat sowohl im Hinblick auf die Narkosetiefe als auch auf die Narkosezeit. Nach Vorbehandlung mit einer äquieffektiven Dosis Evipan ließ sich dieser Effekt nur in geringerem Grade nachweisen. Auch das Inactin wies nach Wiederkehr der Stellreflexe einen deutlich geringeren Verstärkungseffekt auf als das Hydroxydion, wie sich in weiteren Versuchen mit Evipan feststellen ließ. Bei den Ergebnissen der bisherigen Versuche ist zu berücksichtigen, daß die geprüften Stoffe intraperitoneal injiziert wurden und für die Dauer der Narkose unter anderem auch die Resorptionsgeschwindigkeit

verantwortlich gemacht werden muß. So besitzt z. B. das Inactin in hohen Dosen bei intraperitonealer Injektion eine ausgesprochen lange Wirkungszeit. Bei Versuchen an *Kaninchen* ließ sich feststellen, daß zwischen den Wirkungen, welche nach intraperitonealer und intravenöser Injektion auftreten, quantitative Unterschiede bestehen, welche bei dem Steroid nur gering sind und über die normale Streuungsbreite wenig hinausgehen, bei dem Thiobarbiturat sich dagegen deutlich bemerkbar machen.

Die Reihenfolge der Reflexlähmungen blieb bei i.v. und i.p. Injektionen die gleiche und zeigte bei dem Vergleich der Stoffe untereinander

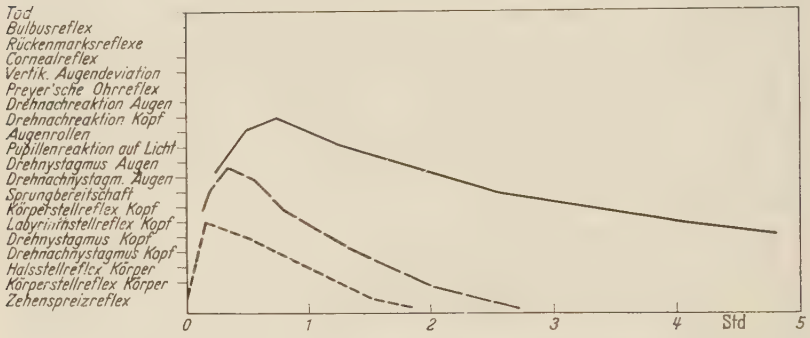


Abb. 3. Narkoseverlauf von Inactin nach Vorbehandlung mit Evipan und Hydroxypregnandion (Meerschweinchen i.p.); - - - - - Eigenwirkung von Inactin (20 mg/kg); — — — Inactinwirkung nach Vorbehandlung mit Evipan (40 mg/kg); ——— Inactinwirkung nach Vorbehandlung mit Hydroxypregnandion (100 mg/kg)

nur geringfügige Abweichungen. So wird der Labyrinthstellreflex auf den Kopf nach Hydroxydion etwas früher beeinträchtigt als nach Evipan und Inactin. Der Cornealreflex bleibt dagegen nach dem Steroid etwas länger nachweisbar als nach den Barbituraten. Es ist bemerkenswert, daß die Reihenfolge der Reflexlähmungen nach Applikation des Steroids so weitgehend der Wirkungsweise von Barbituraten entspricht, daß sie sich ebenso wie Evipan und Inactin in das von Schoen u. Girndt in Versuchen an Kaninchen mit einer ganzen Reihe von Narkotica aufgestellte Narkoseschema einordnen lassen.

So werden nach diesem Schema im Stadium I der Narkose z. B. die Progressivreaktionen und der Halsstellreflex auf den Hinterkörper abgeschwächt und die Tiere zeigen eine leichte Ataxie. Im Stadium II sind die genannten Reflexe erloschen und der Körperstellreflex auf den Körper und der Kopfdrehnystagmus sind beeinträchtigt. Die Labyrinthstellreflexe auf den Kopf und der Körperstellreflex sind im Stadium III deutlich gehemmt, während der Kopfdrehnystagmus z. B. aufgehoben ist. Die Seitenlage wird in diesem Schema dem Stadium III—IV zugeordnet. Die Lähmung des horizontalen Augendrehnystagmus und des Körperstellreflexes auf den Kopf fallen in das Stadium IV. In diesem Zustand sind die kompensatorischen Augenstellungen und der Cornealreflex bereits abgeschwächt. Als Stadium V wird

der Zustand bezeichnet, in welchem lediglich noch die Augendrehreaktionen und die Rückenmarksreflexe auslösbar sind. Im Stadium VI herrscht völlige Reflexlosigkeit. Wie bereits beim Stadium III—IV angegeben, so sind auch bei den anderen Narkosestadien Zwischenstufen erfaßbar.

In Abb. 4 sind die für den Narkoseverlauf nach i.v. Injektionen typischen Ergebnisse wiedergegeben, welche mit nahezu äquieffektiven Dosen der drei Narkotica im Mittel feststellbar waren.

Während die Barbiturat-Kurznarkotica sofort zu einer maximalen Narkosetiefe führen, welche unmittelbar darauf von einer schnellen Abflachung der Narkose gefolgt ist, ist für das Steroid ein langsamerer Anstieg der Narkose mit einer länger

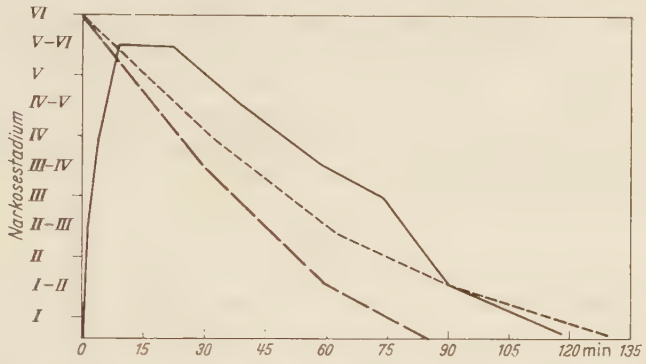


Abb. 4. Narkoseverlauf äquieffektiver Dosen (Kaninchen i.v.) - - - - - Inactin (50 mg/kg) — — — Evipan (40 mg/kg) ——— Hydroxypregnandion (100 mg/kg)

anhaltenden Gipfelwirkung charakteristisch. Außer den in der Abb. 4 angegebenen Dosen wurden auch den Versuchen an Meerschweinchen entsprechende Dosen i.p. und i.v. den Kaninchen injiziert. Auch hierbei zeigte es sich deutlich, daß das Hydroxydion bei höheren Dosen keinen wesentlich längeren Narkoseverlauf aufwies als bei niedrigeren Dosen. So dauerte z. B. bei 40 mg/kg i. v. die Narkose, die hierbei das Stadium III—IV erreichte, etwa 70—90 min, während sie nach Dosen über 100 mg/kg nach Erreichen des Narkosestadiums V -VI nicht mehr als etwa 120 min andauerte. Beim Incatin dagegen führte z. B. eine Steigerung von 40 mg/kg auf 60 mg/kg zu einer Verlängerung der Narkosezeit um das Dreifache auf 180 –200 min. Hierbei war eine Festlegung des maximalen Narkosestadiums schwer möglich, da dieses stark von der Injektionsgeschwindigkeit abhing. Bei gleicher Narkosedauer kamen die Tiere nach dem Thiobarbiturat in tiefere Narkosestadien als nach dem Steroid. Bei gleichen Narkosetiefen von Inactin und Evipan erwies sich das Evipan als deutlich kürzer wirksam.

Um über mögliche *Rindenwirkungen* des Hydroxypregnandions eine Aussage machen zu können, wurden ergänzende Versuche an Katzen durchgeführt, bei welchen besonders die Aufsetzreflexe nach Rademaker geprüft wurden.

Zunächst ließ sich feststellen, daß die Stell- und Haltereflexe unter der Wirkung der drei Narkotica auch bei den Katzen in der gleichen Reihenfolge zum Fortfall kamen, wie bei den anderen Tieren bereits

beschrieben wurde. Bei der Prüfung der Rademakerschen Aufsetzreflexe dagegen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Wirkung des Steroids und der der Barbiturate. Unter Hydroxypregnandion erwiesen sich die Aufsetzreflexe der Pfoten bei Berühren mit der Kante einer Aufsetzfläche (wie z. B. dem Rand einer Tischplatte) als besonders empfindlich. Dieser Reflex konnte bereits bei 10 mg/kg während einiger Minuten nicht mehr ausgelöst werden, in einem Stadium, in welchem die Tiere noch keine Beeinträchtigung der Stellreflexe nach Magnus zeigten. Sie waren bei dieser Dosis auch nicht ataktisch und zeigten noch keine Unsicherheit beim Springen oder Laufen. Bei den vergleichend geprüften Barbituraten fielen diese Rademakerschen Reflexe erst in dem Narkosestadium I—II (nach Girndt) aus, in welchem die Tiere bereits erheblich ataktisch waren.

Diese Befunde zeigen, daß bestimmte Großhirnfunktionen durch das Steroidnarkoticum früher beeinflußt werden konnten als durch die vergleichend geprüften Barbiturate.

Diskussion

Der auffallende Befund, daß so verschiedenartige Substanzen wie das Steroidnarkoticum Hydroxydion und die beiden Barbiturate Evipan und Inactin die Stellreflexe nach Magnus in praktisch der gleichen Reihenfolge lähmen, läßt bei der Empfindlichkeit dieser Reflexe die Annahme berechtigt erscheinen, daß sie einen ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzen.

Die gleiche Reihenfolge der Stellreflexlähmungen konnte auch bei experimentell erzeugten Durchblutungsstörungen des Zentralnervensystems und bei verschiedenen Formen von Sauerstoffmangel beobachtet werden (Kleitmann u. Magnus; siehe auch bei Schaefer), welche hierin den genannten Narkosevorgängen zu gleichen scheinen, die durch Hemmung von Atmungsvorgängen der Hirnzellen bedingt sein sollen. Auch die Befunde von Kleitmann u. Magnus bedürfen hier der Erwähnung, nach denen das Insulin im hypoglykämischen Schock die Stellreflexe ebenfalls in der beschriebenen Reihenfolge zum Ausfall bringt.

Um zu prüfen, wieweit bei der Steroidnarkose neben der rein narkotischen Wirkung auch der Hemmung der vegetativen Zentren eine Bedeutung zukommt, wurden in ergänzenden Versuchen an decerebrierten Meerschweinchen die Dosen festgestellt, welche Kreislauf und Atmung beeinflussen. Hierbei zeigte es sich, daß Hydroxydion erst dann den Blutdruck auffallend senkt, wenn es bereits zu einer Lähmung der Atmung gekommen ist. Die Barbiturate dagegen lassen bereits frühzeitig eine deutliche Blutdrucksenkung erkennen. Durch die Beeinflussung des Blutdrucks kann der spezifisch narkotischen Wirkung eine

additive Wirkung aufgepfropft werden, durch welche der steilere Wirkungsanstieg von Inactin und Evipan wohl zu erklären wäre. Das große Entgiftungsvermögen gegenüber dem Steroid als nahezu körpereigener Substanz kann neben der fast fehlenden Hemmung vegetativer Zentren, welche auch von P'AN, GARDOCKI, HUTCHEON, RUDEL, KODET u. LAUBACH beschrieben wurde, für die große therapeutische Breite verantwortlich gemacht werden. Selbst letale Dosen wurden, wenn es zu keinem Atemstillstand kam, in kurzer Zeit abgebaut und die Tiere gerieten schnell in ein gefahrloses Narkosestadium. Ein Versagen des Entgiftungsmechanismus, welches bei gleichbleibender Dosissteigerung in einem unverhältnismäßig starken Anstieg der Narkosezeit zum Ausdruck kommen müßte (siehe hierzu bei BECK u. LENDLE), konnte bei der Steroidnarkose nicht beobachtet werden.

Die Frage nach dem ersten und hauptsächlichen Angriffspunkt eines Narkosemittels ist in der Pharmakologie häufig gestellt und eine Einteilung der Narkotica in Hirnrindenmittel und Hirnstammnarkotica diskutiert worden (MOLITOR u. PICK; FROMHERZ; LENDLE, SCHOEN u. KOEPPEN; DRIESEN, HAHN u. RUMMEL; u. a.). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen war es möglich, mittels der Aufsetzreflexe von RADEMAKER an Katzen einige Anhaltspunkte für bevorzugte pharmakologische Rindenwirkungen zu bekommen. Im Gegensatz zu den vergleichend geprüften Barbituraten Evipan und Inactin lähmte das Hydroxypregnandion die Aufsetzreflexe zu einem Zeitpunkt, zu dem die Tiere noch keine sichtbare Beeinflussung der MAGNUSschen Stellreflexe zeigten. Man könnte hiernach annehmen, daß die mit den RADEMAKERschen Aufsetzreflexen geprüften Rindenfunktionen (sensomotorische Rinde) als erste ausgeschaltet werden. Es würde sich also um eine zunächst auftretende Rindenwirkung handeln. Da jedoch die häufig diskutierte Einteilung der Narkotica in Hirnrinden- und Hirnstammmittel auf Grund neuerer physiologischer Untersuchungen (MAGOUN; siehe auch bei FULTON) in Frage gestellt ist, soll hier nicht gesagt werden, daß der Angriffspunkt des Hydroxydions auch tatsächlich speziell im Bereich der Großhirnrinde liegen muß. Durch eine Beeinflussung tiefer liegender, die Großhirnrinde sekundär beeinflussender Zentren könnte hier auch eine lediglich als indirekt aufzufassende Beeinträchtigung der Rindenfunktion vorliegen.

Die beschriebenen Wirkungen lassen das genannte Steroid als ein „Kurznarkoticum" geeignet erscheinen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Tiere nach Abklingen der Narkose oft noch für einige Stunden geringgradig ataktisch waren, und selbst mehrere Stunden nach Abklingen der eigentlichen Narkosewirkung des Steroids die Wirkung eines zusätzlich injizierten Narkoticums beträchtlich verstärkt wurde. So ist wohl die klinische Beobachtung erklärbar, daß mit dem

Steroidnarkoticum vorbehandelte Patienten auch bei anderen narkotisch wirkenden Stoffen eine unverhältnismäßig lange Narkosedauer aufwiesen, was z. B. in einer Verlängerung der Lachgasnarkose deutlich zum Ausdruck kam (Murphy, Guardagni u. De Bon; Just u. Ibe). Über die Ursache dieser hypnotischen Nachwirkung lassen sich an Hand der vorliegenden Befunde noch keine Aussagen machen. Möglicherweise wird dieser körpereigene Stoff, welcher als Abbauprodukt des Desoxycorticosterons im Organismus vorkommt, in unphysiologisch hohen Dosen relativ schnell inaktiviert, jedoch nach Unterschreiten einer bestimmten Schwelle in die üblichen langsamer ablaufenden Abbauvorgänge einbezogen. Ob diese hypnotischen Spätwirkungen durch eine Beeinflussung des Mineralstoffwechsels, wie sie Woodbury im Tierversuch nach der Gabe von Mineralocorticoiden feststellte, bedingt sein können, läßt sich noch nicht sagen.

Summary

The action of Hydroxypregnanedione on the postural reflexes (Magnus) and the "Aufsetzreflexe" (Rademaker) were studied on guinea pigs, rabbits and cats. The corresponding effects of Inaktin and Evipan were examined by the way of comparison. In addition further steroids were investigated.

During the steroid-anesthesia the postural reflexes (Magnus) were paralyzed in approximately the same successive order, as observed with the compared barbiturates.

Hydroxypregnanedione showed an exceptional large therapeuthical index. Subletal doses were very soon eliminated.

In contrast to the other narcotics the steroid anaesthetic agent produced a longer lasting light hypnotic stage which was still observed after the recovery of the reflexes.

The "Aufsetzreflexe" (Rademaker) which depend to a high degree on the function of the cerebral cortex, are abolished by doses of Hydroxypregnanedione which are still ineffective on the postural reflexes.

Literatur

Eickstedt, K.-W. v.: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 476. — Fromherz, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **121**, 273 (1927). — Gaudin, P., u. G. Hossli: Der Anaesthesist, **5**, 80 (1956). — Girndt, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **167**, 90 (1932); **181**, 142 (1936). — Gordan, G. S., and H. W. Elliot: Endocrinology (Springfield, Ill.) **41**, 517 (1947). — Gordan, G. S., N. Guardagni, J. Picchi et J. E. Adams: Méd. et Hyg. **13**, 251 (1955). — Howland, W. S., C. Boyan and K. Ch. Wang: Anesthesiology **17**, 1 (1956). — Just, O., u. K. Ibe: Chirurg **26**, 505 (1955). — Kleitman, N., u. R. Magnus: Pflügers Arch. **205**, 142 (1925). — Laubach, G. D., S. Y. P'an and H. W. Rudel: Science (Lancaster, Pa.) **122**, 78 (1955). —

Lendle, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **143**, 108 (1929). — Magnus, R.: Die Körperstellung. Berlin: Springer 1924. — Magoun, H. W.: Physiologic. Rev. **30**, 459 (1950). - Merryman, W., R. Boiman, L. Barnes and I. Rothchild: J. Clin. Endocrin. **14**, 1567 (1954). — Molitor, H., u. E. P. Pick: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **107**, 185 (1925); **115**, 318 (1926). — Murphy, F. J., N. P. Guardagni and F. De Bon: J. Amer. Med. Assoc. **158**, 1412 (1955). — P'an, S. Y., J. F. Gardocki, D. E. Hutcheon, H. Rudel, M. J. Kodet and G. D. Laubach: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **115**, 432 (1955). — Rademaker, G. G. J.: Das Stehen. Berlin: Springer 1931. — Schaefer, K.-P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 556 (1956). - Schoen, R., u. S. Koeppen: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **154**, 115 (1930). — Selye, H.: J. of Immun. **41**, 259 (1941). — Aesth. and Analg. N. Y. (Curr. Res. in Anesth. and Analg.) **21**, 41 (1942). — Endocrinology (Springfield, Ill.) **30**, 437 (1942). - Woodbury, D. M.: Recent Progress in Hormone Research. New York. **10**, 65 (1954).

Dr. K.-W. von Eickstedt, Pharmakologisches Institut der Universität Göttingen
Dr. K.-P. Schaefer, Universitäts-Nervenklinik, Göttingen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 568—579 (1956)

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)

Zur Wirkung von Butazolidin im Intermediärstoffwechsel

Von
K. H. Bässler und K. Lang

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 21. September 1956)

Über Stoffwechselwirkungen von Antiphlogisticis weiß man außerordentlich wenig. Während der Begriff Entzündung morphologisch eindeutig definiert ist, ist er biochemisch noch kaum faßbar, und so ist es nicht möglich, Beziehungen zwischen Stoffwechselwirkungen einer Substanz und ihrem Einfluß auf das entzündliche Geschehen herzustellen. Es wäre jedoch denkbar, daß eine gründliche Kenntnis der Stoffwechselwirkungen von Antiphlogisticis Rückschlüsse auf die Art der veränderten Stoffwechselvorgänge im entzündeten Gewebe zuließe. Gegenwärtig arbeiten in Deutschland mehrere Laboratorien an der Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Butazolidin (Geigy). Im Rahmen dieser Zusammenarbeit haben wir die Wirkung von Butazolidin in bestimmten Bereichen des Intermediärstoffwechsels untersucht. Kurz vor der Drucklegung dieser Arbeit bekamen wir Kenntnis von einer Untersuchung von Exer[3], die sich bezüglich der Wirkungen von Butazolidin auf den Citronensäurecyclus mit unserer Arbeit deckt und im wesentlichen mit unseren Befunden übereinstimmt.

Methodik

Mitochondrien wurden nach Schneider[16] in 0,25 m Rohrzucklösung isoliert. Das Suspensionsmedium hat folgende Zusammensetzung (Endkonzentrationen): KH_2PO_4 0,013 m; Trispuffer 0,029 m; $MgSO_4$ 0,005 m; KCl 0,02 m; ATP 0,0018 m; Cytochrom c 0,015 μMol pro Ansatz. Die Mitochondrien von 10 g Gewebe wurden in 10 ml dieses Mediums suspendiert.

Behandlung der Mitochondrien zur Untersuchung der einstufigen Succinatoxydation: Darstellung wie oben beschrieben. Die Mitochondrien werden dann in einer Mischung von gleichen Teilen m/15 Phosphatpuffer und 0,001 m $CaCl_2$ aufgenommen und die Suspension in Erlenmeyerkölbchen 10 min bei 37° C geschüttelt. Von dieser Suspension kommen 0,5 ml in den Ansatz.

Cyclophorasesystem wurde nach Green[5] dargestellt. Die Menge von 10 g Frischgewebe wurde in 10 ml 0,9%iger KCl-Lösung von p_H 7,4 suspendiert.

Die Gewinnung von Zellkernen erfolgte nach Lang u. Siebert. Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme bzw. Kohlendioxydentwicklung erfolgte in üblicher Weise mit der Warburg-Methode. Die Untersuchung der Oxalacetat-Decarboxylierung wurde nach Ochoa durchgeführt[15], die Darstellung von Taubenleberpulver und die

Acetylierung von Sulfanilamid erfolgte nach Kaplan u. Lipmann[10], die Sulfanilamidbestimmung nach Druey u. Oesterheld[1]. Zur Bestimmung der Glykolyse nach der Warburg-Technik verwendeten wir das Inkubationsmedium von Stoesz u. LePage[19]. Zur Gewinnung von Hefe-Acetontrockenpulver wurde Bierhefe der Mainzer Aktienbrauerei auf der Zentrifuge solange mit Leitungswasser gewaschen, bis das Waschwasser farblos blieb. Dann folgten drei Waschungen mit 0,1 m Na_2HPO_4. Das Sediment wurde mit dem 5fachen Volumen eiskaltem Aceton homogenisiert, auf einem Büchner-Trichter abgesaugt und im Exsiccator getrocknet. Zur Arginase-Bestimmung wie bei Lang u. Mitarb.[14] wurde der aus Arginin abgespaltene Harnstoff in Conway-Zellen mit Urease zerlegt und NH_3 mit Nesslers Reagens colorimetrisch bestimmt. Urease wurde aus Sojamehl nach Kay u. Reid[11] dargestellt. Zur Acetessigsäurebestimmung wurden die Ansätze nach Folin-Wu enteiweißt und in aliquoten Teilen des Filtrats Aceton nach Destillation im Apparat nach Lang[12] jodometrisch bestimmt.

Zur Xanthinoxydasebestimmung wurde 20%iges Leberhomogenat in m/15 Phosphatpuffer p_H 7,6 15 min bei 18000 g zentrifugiert und das Überstehende verwandt.

Xanthinoxydase aus Rahm wurde nach Kalckar[9] gereinigt. Die Bestimmung erfolgt im Zeiß-Spektralphotometer durch Messung der Extinktionszunahme bei 290 mμ.

Die Ansätze sind jeweils bei den Tabellen angegeben. Die Zahlen sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Substrate wurden als Na-Salze angewandt. DPNH war ein käufliches Präparat von Boehringer. Butazolidin der Firma Geigy (Reinsubstanz) wurde mit NaOH auf p_H 7,4 gebracht.

Versuche

Wir untersuchten zunächst den Einfluß von Butazolidin (BZD) auf Reaktionen des Citronensäurecyclus. Als Endkonzentration an BZD in den Ansätzen wählten wir 10 mg-% ($3{,}24 \cdot 10^{-4}$ m), weil dieser Wert mit dem Blutspiegel bei BZD-Therapie verglichen werden kann.

1. Versuche mit Rattenleberhomogenaten: Bei der angewandten BZD-Konzentration wird die Leeratmung der Homogenate in etwa der Hälfte der Fälle gehemmt. Die Wirkung ist außerordentlich schwankend und hängt in hohem Maß vom Ernährungszustand des verwendeten Tieres ab. Das gleiche gilt für die Atmung nach Zusatz von Substraten. Um klare Verhältnisse zu bekommen, arbeiteten wir deshalb weiterhin mit Mitochondriensuspensionen oder mit Cyclophorasesystem. Bei beiden Präparationen hat man praktisch keine Leeratmung.

2. Versuche mit Mitochondrien und Cyclophorasesystem: Aus Tab. 1 ist der Einfluß von BZD auf die Oxydation verschiedener Substrate des Citronensäurecyclus und von Pyruvat zu sehen. Bei Pyruvat, α-Ketoglutarat und Malat findet man regelmäßig eine starke Hemmung, bei Succinat sind die Ergebnisse wechselnd und bei Citrat findet man keine Hemmung. Eine genauere Lokalisation der Hemmung läßt sich unter diesen Bedingungen nicht geben, da bei guten Enzympräparationen die Substrate vollständig oxydiert werden. Eine Hemmung der Succinatoxydation könnte deshalb ebensogut auf einer späteren Stufe liegen,

Tabelle 1. *Einfluß von BZD auf die Oxydation von Pyruvat und Substraten des Citronensäurecyclus*

Ansatz: 0,5 ml Mitochondriensuspension, 50 μMol Substrat, bei Versuchen mit Pyruvat 50 μMol Na-bicarbonat, dest. Wasser ad 2,0; im Einsatz 0,2 ml 2 n NaOH, Luft im Gasraum. p_H 7,2, Temperatur 37 °.

Ansatz mit Cyclophorasesystem: 0,5 ml Cyclophorasesystem, 1,0 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4, 3 μMole ATP, 4 μMole $MgSO_4$, 0,03 μMole Cytochrom c, 50 μMole Substrat, bei Pyruvat 50 μMol Na-bicarbonat, dest. Wasser ad 3,0. NaOH im Einsatz

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std pro mg N (Mitochondrien) bzw. pro 10 mg N (Cyclophorasesystem)		% Hemmung
		ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
Pyruvat	Mitochondrien	245	1	100
		290	22	90
		90	0	100
	Cyclophorase	440	190	60
		320	90	70
		670	130	80
α-Ketoglutarat	Mitochondrien	150	0	100
		260	20	90
		165	60	60
		220	94	60
		190	5	100
		170	10	95
	Cyclophorase	2000	1500	25
		1600	1050	30
		1800	730	60
		1150	204	80
Citrat	Mitochondrien	130	130	0
		235	230	0
		140	120	15
		250	255	0
	Cyclophorase	1200	960	20
Succinat	Mitochondrien	360	200	45
		370	345	0
		165	170	0
Malat	Mitochondrien	90	5	95
		125	10	90
		80	0	100
		95	10	90
		180	0	100
	Cyclophorase	1300	670	50

beispielsweise bei der Malatoxydation, eine Hemmung der Malatoxydation könnte auf Hemmung der Pyruvatoxydation beruhen usw. Wir untersuchten daher die fraglichen Reaktionsschritte isoliert. Im Fall der Bernsteinsäure läßt sich das durch einen einfachen, von ERNSTER u. Mitarb.[2] beschriebenen Kunstgriff erreichen. Nach kurzer Incubation der Mitochondrien mit Phosphat und Ca^{++} geht die Fähigkeit zu DPN-abhängigen Substratoxydationen verloren, während die Fähigkeit zur einstufigen Oxydation Succinat → Fumarat erhalten bleibt. Unter diesen Bedingungen läßt sich zeigen, daß die Bernsteinsäureoxydation durch BZD nicht gehemmt wird (Tab. 2).

Tabelle 2. *Einfluß von BZD auf die einstufige Oxydation Succinat → Malat durch Mitochondrien*
Ansatz: Wie Tab. 1 für Mitochondrien, Mitochondrienvorbehandlung wie unter Methodik beschrieben

mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std pro mg N		% Hemmung
ohne BZD	mit 10 mg% BZD	
102	103	0
360	355	0

Die einstufige Oxydation Malat → Oxalacetat läßt sich nach GREEN[5] untersuchen, wenn man mit Cyclophorasesystem bei p_H 9 arbeitet. Unter diesen Bedingungen wird Pyruvat nicht oxydiert. Aus Tab. 3 ist ersichtlich, daß die Oxydation von Malat zu Oxalacetat durch BZD nicht gehemmt, sondern sogar etwas aktiviert wird. — Die Decarboxylierung von Oxalacetat zu Pyruvat wird nicht gehemmt, wie Tab. 4 zeigt.

Tabelle 3. *Einfluß von BZD auf die einstufige Oxydation Malat → Oxalacetat im Cyclophorasesystem*
Ansatz: Wie Tab. 1 für Cyclophorasesystem, nur Tris-Puffer p_H 9 statt Phosphatpuffer

mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std pro 10 mg N		% Aktivierung
ohne BZD	mit 10 mg% BZD	
310	380	20
390	470	40

Es wird also offensichtlich die oxydative Decarboxylierung der beiden Ketosäuren Brenztraubensäure und α-Ketoglutarsäure gehemmt. Diese Hemmung findet man auch, wenn die Substrate unter anaeroben Bedingungen mit Ferricyanid als Elektronenacceptor oxydiert werden (Tab. 5). Man findet weiterhin eine Hemmung der Sulfanilamidacetylierung mit Pyruvat als Acetyl-Donator (Tab. 6), während die Acetylierung mit Acetat nicht gehemmt ist (Tab. 7). Im ersten Fall geht der Übertragung von Acetyl-Coenzym A auf Sulfanilamid die oxydative Decarboxylierung von Pyruvat voraus, im zweiten Fall nur die Aktivierung von Acetat.

Da hinsichtlich der Cofaktoren bei beiden Systemen - Pyruvatoxydase und α-Ketoglutaratoxydase — weitgehende Analogie besteht, läßt sich denken, daß BZD an einem der Cofaktoren angreift.

Coenzym A kann dabei nicht betroffen sein, da die Sulfanilamidacetylierung mit Acetat in Taubenleberextrakten durch BZD nicht gehemmt wird (Tab. 7). Voraussetzung für diese Reaktion ist ja die Aktivierung von Acetat, d. h. die Veresterung mit Coenzym A, die demnach nicht gehemmt sein kann.

Cocarboxylase als Angriffspunkt ist ebenfalls auszuschließen, da Zugabe von Cocarboxylase im Cyclophorasesystem die BZD-Hemmung nicht rückgängig macht und da die anaerobe Pyruvat-Decarboxylierung durch Acetontrockenpulverpäparate von Bierhefe nicht gehemmt wird (Tab. 8).

DPN scheidet als Angriffspunkt ebenfalls aus, da die DPN-pflichtige Äpfelsäuredehydrogenase nicht gehemmt wird und die DPNH-Oxydation unbeeinflußt bleibt (Tab. 9).

Es fällt auf, daß die BZD-Hemmung der Pyruvatoxydation wie der α-Ketoglutaratoxydation durch Mn^{++}-Ionen aufgehoben oder verringert werden kann (Tab. 9). Wie aus dieser Tabelle zu entnehmen ist, bleibt die Substratoxydation durch geringere Konzentrationen an Mn^{++} ($1{,}66 \cdot 10^{-3}$ m) unbeeinflußt, die Hemmung durch BZD wird dagegen weitgehend aufgehoben. Bei höheren Mn^{++}-Konzentrationen ($3{,}3 \cdot 10^{-3}$m) wird die Substratoxydation etwas beeinträchtigt, die BZD-Hemmung aber

Tabelle 4. *Einfluß von BZD auf die Decarboxylierung von Oxalacetat*
Ansatz: 1 ml Enzymlösung (0,5 g Taubenleber-Trockenpulver mit 10 ml dest. Wasser extrahiert), 0,5 ml $1{,}6 \cdot 10^{-3}$ m $MnSO_4$, 0,5 ml 0,04 m Oxalacetat im Anhang; 0,5 ml 2 m Acetatpuffer p_H 5,6; dest. Wasser, Endvolumen 3,0 ml. Nach 5 min Temperaturausgleich (25° C) wird das Substrat eingekippt

mm^3 CO_2-Entwicklung in 1 Std		% Hemmung
ohne BZD	mit 10 mg% BZD	
115	105	0
100	120	0

Tabelle 5. *Einfluß von BZD auf die Oxydation von α Ketonsäuren durch Ferricyanid.*
Ansatz: 0,5 ml Cyclophorasesystem, 3 μMol ATP, 4 μMol $MgSO_4$, 50 μMol Substrat, 50 μMol Na-bicarbonat, 0,2 ml 0,5 m Kaliumferricyanid, dest. Wasser ad 3,0; Gasraum: 95% N_2, 5% CO_2

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 CO_2-Entwicklung in 1 Std pro 10 mg N		% Hemmung
		ohne BZD	mit 10 mg% BZD	
Pyruvat	Cyclophorase	180	77	60
		240	130	50
		280	150	50
		620	170	70
Ketoglutarat	Cyclophorase	420	280	35
		740	340	50
		300	230	25
		620	290	50

trotzdem rückgängig gemacht. Analysiert man diese Verhältnisse im zeitlichen Verlauf bei längerer Beobachtung, so sieht man, daß die BZD-Hemmung in Gegenwart von Mn^{++} später auftritt (Abb. 1). Mg^{++}-Ionen können Mn^{++}-Ionen in dieser Wirkung nicht ersetzen.

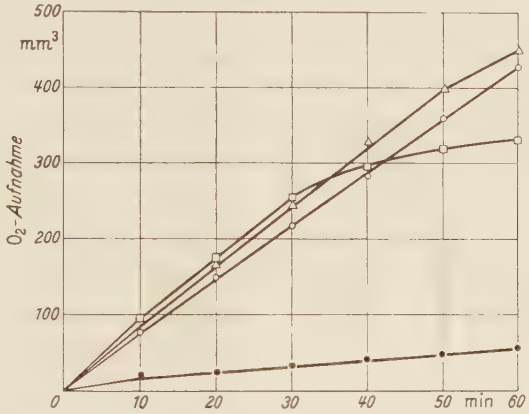


Abb. 1. Die Wirkung von Mn^{++} auf die BZD-Hemmung der α-Ketoglutaratoxydation
○ ohne BZD, ohne Mn^{++}; ● $3 \cdot 10^{-4}$ m BZD, ohne Mn^{++}; △ ohne BZD, $3 \cdot 10^{-3}$ m Mn^{++};
□ $3 \cdot 10^{-4}$ m BZD, $3 \cdot 10^{-3}$ m Mn^{++}

Tabelle 6. *Einfluß von BZD auf die Acetylierung von Sulfanilamid mit Pyruvat.* Ansatz: 1 ml Enzymlösung (1 g Taubenleber-Trockenpulver mit 10 ml 0,033 m $MgSO_4$ extrahiert), 1,5 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4; 0,75 μMol DPN, 0,5 ml 0,0008 m Sulfanilamid, 50 μMol Pyruvat, dest. Wasser ad 4,0. 1 Std bei 37° C im Wasserbad geschüttelt

γ Sulfanilamid acetyliert		% Hemmung
ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
25	8	70
55	47	15
32	25	20

Tabelle 7. *Einfluß von BZD auf die Acetylierung von Sulfanilamid mit Acetat.* Ansatz: 1 ml Enzymlösung (1 g Taubenleber-Trockenpulver mit 15 ml 0,02 m $NaHCO_3$ extrahiert), 100 μMol Acetat, 6 μMol ATP, 8 μMol $MgSO_4$, 2,5 μMol Cystein, 2 μMol Na-citrat, 0,8 ml 0,1 m Na-bicarbonatlösung, 1 ml 0,0008 m Sulfanilamid, 1 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4; Endvolumen 6,0 ml

γ Sulfanilamid acetyliert		% Hemmung
ohne BZD	mit 10 mg-%BZD	
21	23	0
13	13	0
25	25	0

Fragt man sich nach dem Mechanismus dieser Wirkung, so könnte man an Komplexbildung zwischen BZD und Mn^{++} denken und die BZD-Wirkung auf die Ketosäureoxydation durch Entfernung von Mn^{++}-Ionen aus dem System erklären. Dafür konnten wir jedoch keinen Beweis finden. Das UV-Spektrum von BZD wird nicht, wie bei einer Komplexbildung zu erwarten wäre, durch Mn^{++} verändert.

Wir untersuchten ferner, ob andere Mn-abhängige Systeme durch BZD gehemmt werden:

1. Die Decarboxylierung von Oxalessigsäure ist Mn-abhängig und wird, wie Tab. 4 zeigt, durch BZD nicht gehemmt.

2. Arginase ist nach Lang u. Siebert[14] im Zellkern reichlich vorhanden, aber nicht voll aktiv, da die Mn^{++}-Konzentration im Zellkern sehr gering ist. Wir untersuchten deshalb den Einfluß von BZD auf die Arginaseaktivität gründlich gewaschener Zellkernsuspensionen und fanden keine Hemmung (Tab. 10).

Tabelle 8. *Einfluß von BZD auf die Pyruvat-Decarboxylase von Bierhefe*
Ansatz: 0,5 ml Enzymsuspension (1 g Hefetrockenpulver mit 100 ml dest. Wasser homogenisiert), 0,5 ml 0,1 m Phosphatpuffer p_H 5,6; 0,5 ml 0,01 m $MnSO_4$, 25 μMol Pyruvat, dest. Wasser ad 3,0 ml. Im Gasraum 95% N_2, 5% CO_2

mm^3 CO_2-Entwicklung pro mg N in 1 Std		% Hemmung
ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
1550	1400	10
1120	1100	0
1050	1070	0
1500	1400	0

3. Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe ist nur in Gegenwart von Mn^{++} aktiv und wird durch BZD nicht gehemmt (Tab. 7).

Es ist also noch unklar, auf welche Weise die Manganwirkung auf die BZD-Hemmung der Ketosäureoxydation zustandekommt. Wir halten sie für unspezifisch. Aus Untersuchungen von Hunter[7] weiß man, daß Mn^{++}-Ionen einen besonders wirksamen Schutz darstellen gegen unspezifische Schädigungen von Mitochondrien, die zu Schwellung führen.

Tabelle 9. *Einfluß von Mn^{++} auf die Hemmung der Oxydation von Pyruvat und α-Ketoglutarat durch BZD*
Ansätze: Wie bei Tab. 1 für die entsprechenden Substrate und Enzympräparate angegeben

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std pro mg N (Mitochondrien) bzw. pro 10 mg N (Cyclophorasesystem)					
		ohne Mn		$1{,}66 \cdot 10^{-3}$ mMn		$3{,}3 \cdot 10^{-3}$ m Mn	
		ohne BZD	mit BZD	ohne BZD	mit BZD	ohne BZD	mit BZD
Pyruvat	Cyclophorase	510	26			370	245
		1000	200			640	340
α-Ketoglutarat	Mitochondrien	103	35			255	260
		152	3			77	75
		250	8			210	190
	Cyclophorase	1330	570			810	690
		1150	210			710	720
		1400	15	1560	1620		
		1330	10	1260	1130		

Mn^{++}-Ionen haben einen Einfluß auf den Stoffwechsel von BZD selbst. Bei Incubation mit Cyclophorasesystem führt BZD nach längerer Induktionszeit (30—60 min) zu Sauerstoffaufnahme, es wird also vermutlich oxydiert. Diese Sauerstoffaufnahme durch BZD wird durch Mn^{++} ($3{,}3 \cdot 10^{-3}$ m) völlig unterdrückt.

Da BZD durch Mitochondrien nicht oxydiert wird, läßt sich annehmen, daß es durch im Cyclophorase-Gel enthaltene Mikrosomen umgesetzt wird. Den Beweis für diese Ansicht konnten wir erbringen durch Rekombination von isolierten Mitochondrien mit isolierten Mikrosomen. Man findet aber sonst keine Indizien, die es erlaubten, ein Stoffwechselprodukt von BZD, dessen Entstehung durch Mn^{++} gehemmt wird, für die Hemmung der Ketosäureoxydation verantwortlich zu machen. Die BZD-Hemmung setzt sofort ein, wenn noch keine BZD-Oxydation stattgefunden hat.

Tabelle 10. *Einfluß von BZD auf die Arginase von Leberzellkernen*

Ansatz: 1 ml Kernsuspension in Glykokollpuffer p_H 9,5 (entspricht 0,15 g Frischleber und enthält 1,5—2,0 mg N), 2,5 ml 0,01 m Arginin (Hydrochlorid mit NaOH auf p_H 9,5 gebracht), 2,5 ml Glykokoll-Puffer p_H 9,5, dest. Wasser ad 7,5 ml. 20 min bei 37° C geschüttelt

Mikromole Arginin gespalten in 20 min pro mg N		% Hemmung
ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
11,0	10,7	0
15,3	14,7	0
13,5	13,5	0

Tabelle 11. *Einfluß von BZD auf die Oxydation von DPNH*

Ansatz: 0,5 ml Mitochondriensuspension. 1,0 ml 0,02 m DPNH, sonst wie Tab. 1

mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std pro mg N		% Hemmung
ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
156	154	0
165	175	0

Tabelle 12. *Einfluß von BZD auf die Fettsäureoxydation*

Ansatz: Wie bei Tab. 1 für Mitochondrien bzw. Cyclophorasesystem angegeben. Dazu jeweils 5 μMol Succinat als „sparker"

Substrat	Enzym	mm^3 O_2-Aufnahme in 1 Std pro mg N (Mitochondrien) bzw. 10 mg N (Cyclophorase)		% Hemmung
		ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
Acetat	Cyclophorase (Rattenniere)	340 430	21 230	90 45
Butyrat	Mitochondrien (Rattenleber)	190	5	95
Capronat	Mitochondrien (Rattenleber)	160	20	90

Bei der Betrachtung der Cofaktoren des Pyruvat- bzw. α-Ketoglutaratoxydasesystems bleiben nun per exclusionem Lipoinsäure und die damit verbundenen Reaktionen übrig. Diese Frage ist noch nicht näher untersucht und bedarf erst einer experimentellen Prüfung.

In unseren Versuchen finden wir keine Hemmung der Atmungskette durch BZD. Die Oxydationen von Citrat zu α-Ketoglutarat, von Succinat zu Fumarat und von Malat zu Oxalacetat laufen ungestört ab. Da wir die Sauerstoffaufnahme messen, müßte eine Hemmung zu sehen sein, wenn durch BZD der Elektronentransport vom Substrat über die Atmungskette zum Sauerstoff gestört würde.

Tabelle 13. *Einfluß von BZD auf die Acetacetatbildung aus Acetat*
Ansatz: 2,0 ml Cyclophorasesystem aus Rattenleber, 2,0 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,4; 50 μMol Acetat, 6 μMol ATP, 8 μMol $MgSO_4$, dest. Wasser ad 8,0

Mikromole Acetatacetat entstanden in 1 Std		% Hemmung
ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
1,0	0,37	63
0,8	0,06	90
1,1	0,20	80
1,4	0,90	35

Auch die Oxydation von zugesetztem DPNH durch Mitochondrien wird durch BZD nicht gehemmt (Tab. 11).

Als weiterer Stoffwechselbereich wurde die Fettsäureoxydation untersucht. Wie aus Tab. 12 hervorgeht, wird die Oxydation von Acetat durch Cyclophorasesystem aus Rattenniere und von Butyrat und Capronat durch Cyclophorasesystem aus Rattenleber durch BZD gehemmt. Es ist aber unter diesen Versuchsbedingungen nicht möglich, zu entscheiden, ob diese Hemmung den Fettsäurecyclus selbst betrifft. Die Fettsäureoxydation läuft nämlich im Cyclophorasesystem und in Mitochondriensuspensionen nur ab, wenn gleichzeitig ein Glied des Citronensäurecyclus („sparker") oxydiert wird. Die Blockierung des Citronensäurecyclus durch Hemmung der α-Ketosäureoxydation könnte auf diese Weise indirekt die Fettsäureoxydation unmöglich machen.

Tabelle 14. *Einfluß von BZD auf die anaerobe Glykolyse*
Ansatz: 0,5 ml 10%iges Rattenleberhomogenat, 1,5 ml Suspensionsmedium (s. Methodik), 0,5 ml 0,006 m Hexosediphosphat als Mg-Salz, 0,75 μMol DPN, dest. Wasser ad 3,0. Im Gasraum 95% N_2, 5% CO_2

Substrat	Enzym	mm^3 CO_2-Entwicklung in 1 Std pro mg N		% Hemmung
		ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
Hexose-diphosphat	Rattenleber-homogenat	300	300	0
		240	180	25
		210	190	10
		260	230	10

Auf die Möglichkeit direkter Angriffspunkte im Fettsäurecyclus weist jedoch der in Tab. 13 demonstrierte Befund hin, daß die Acetessigsäurebildung aus Acetat durch BZD gehemmt wird. Da nach der ungestörten Sulfanilamidacetylierung zu schließen (Tab. 7) die Acetataktivierung

Tabelle 15a. *Einfluß von BZD auf die Xanthinoxydase aus Rattenleber*
Ansatz: 1 Enzymlösung (s. Methodik), 1 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,6, 25 μMol Hypoxanthin (mit NaOH auf p_H 7,6 gebracht), dest. Wasser ad 3,0. 0,2 ml 2 n NaOH im Einsatz

Substrat	Enzym	mm^3 O_2-Aufnahme in 3 Std		% Hemmung
		ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
Hypoxanthin	Rattenleber	120	110	0
		240	220	0
		260	300	0

nicht gehemmt ist, müßte dieser Befund als Hemmung der β-Ketothiolase interpretiert werden. Eingehendere Untersuchungen darüber sind beabsichtigt.

In der Literatur wird die Vermutung ausgesprochen, daß durch BZD die Glykolyse gehemmt werde[4]. Wir untersuchten diese Frage mit verdünnten Rattenleberhomogenaten unter Verwendung von Hexosediphosphat als Substrat und fanden teilweise keine, teilweise eine geringgradige Hemmung (Tab. 14). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Befunden von Holzer[8] an Hefezellen, bei denen die Hemmung der Gärung durch BZD wesentlich geringer ist, als die Hemmung der Atmung.

Tabelle 15b. *Einfluß von BZD auf Xanthinoxydase aus Rahm*
Ansatz: 2,5 μMol Hypoxanthin, 0,5 ml m/15 Phosphatpuffer p_H 7,6; 0,5 ml stark verdünnte Enzymsuspension (s. Methodik), dest. Wasser ad 2,5 ml. Messung der Extinktionszunahme bei 290 mμ; Start durch Zugabe der Enzymsuspension. Angabe in 1/1000 Extinktionseinheiten.

Aktivität (ΔE_{290}/min)	
ohne BZD	mit 10 mg-% BZD
30	30

Schließlich untersuchten wir als Vertreter von Flavinenzymen Xanthinoxydase und D-Aminosäureoxydase.

Xanthinoxydase im Überstehenden von Rattenleberhomogenaten (Tab. 15a) und nach Kalckar[9] teilweise gereinigte Xanthinoxydase aus Rahm (Tab. 15b) wird durch BZD nicht gehemmt.

Aus Tab. 16 geht hervor, daß auch D-Aminosäureoxydase nicht gehemmt wird. Das geeignete Substrat zur Untersuchung ist D-Methionin, weil das Produkt der oxydativen Desaminierung, α-Keto-γ-thiomethylbuttersäure wie im Cyclophorasesystem[13] auch in unserem Mitochondrienpräparat quantitativ liegen bleibt. Somit läßt sich der einzelne

Tabelle 16. *Einfluß von BZD auf die D-Aminosäureoxydase*
Ansatz: Wie in Tab. 1 für Mitochondrien angegeben

Substrat	Enzym (Rattenleber)	mm^3 O_2-Aufnahme in 2 Std pro mg N		% Hemmung
		ohne BZD	mit 10 mg-% BZD	
D, L-Alanin	Mitochondrien	160	100	40
		250	120	50
D-Methionin	Mitochondrien	90	85	0
		105	100	0
		100	95	0

Schritt der oxydativen Desaminierung isoliert untersuchen. Die scheinbare Hemmung mit D, L-Alanin als Substrat beruht darauf, daß die Oxydation des Produktes der oxydativen Desaminierung, Brenztraubensäure, durch BZD gehemmt wird.

Diskussion

Unsere Versuche beweisen, daß BZD durch Hemmung der oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat und α-Ketoglutarat wesentlich auf den intermediären Stoffwechsel einwirkt. Wir wollen hier nicht Stellung nehmen zu der Frage, ob diese Eigenschaft mit der antiphlogistischen Wirkung oder mit toxischen Effekten bei gewissen Fällen von Überdosierung in Beziehung steht. Von den bisher beschriebenen Stoffwechselwirkungen von BZD kann nur die von Staudinger[18] entdeckte Hemmung des Cortisonabbaus direkt und eindeutig auf die antiphlogistische Wirkung bezogen werden. Die klinischen Erfahrungen sprechen jedoch dafür, daß das nicht der einzige Mechanismus der BZD-Wirkung sein kann.

Die in unseren Versuchen angewandte Konzentration von 10 mg-% entspricht etwa dem Blutspiegel bei einer üblichen Butazolidinbehandlung mit initialem Stoß und anschließender Erhaltungsdosierung. Über die entsprechenden BZD-Konzentrationen in den Zellen liegen zur Zeit noch keine konkreten Daten vor. Es mag sein, daß hier wesentlich geringere Konzentrationen vorliegen, es wäre aber auch denkbar, daß im entzündeten Gewebe höhere Konzentrationen an BZD möglich sind, als in anderen Geweben. In diesem Zusammenhang ist eine Beobachtung von Sedlmayr u. Mitarb.[17] von Bedeutung, nach der die Penetration von BZD in Hefezellen p_H-abhängig ist und mit fallendem p_H zunimmt.

Über den Angriffpunkt von BZD im Pyruvat- bzw. α-Ketoglutaratoxydasesystem läßt sich bis jetzt noch nichts nähreres aussagen; auch die Wirkung von Mangan bedarf noch einer Klärung. Exer[3] fand in der eingangs erwähnten Untersuchung im Gegensatz zu uns keinen Einfluß

von Mangan auf die BZD-Hemmung. Dieser Unterschied beruht auf der geringeren Mn^{++}-Konzentration ($3 \cdot 10^{-4}$ m) mit der er arbeitete.

Wir finden in unseren Versuchen keine Hemmung der Atmungskette durch BZD. HILLER[6] beschrieb eine Hemmung der DPNH-Oxydation in Leberhomogenaten, die aber erst bei BZD-Konzentrationen um 20 mg-% nennenswert ist.

Summary

Butazolidin (Phenylbutazone) inhibits the oxidative decarboxylation of pyruvate and α-ketoglutarate in a final concentration of 10 mg-% ($3{,}24 \cdot 10^{-4}$ m).

Data are presented suggesting that the β-ketothiolase is inhibited.

The following enzymes or enzyme systems are not inhibited: The enzymes of the respiratory chain, the enzymes of the citric acid cycle with exception of α-ketoglutaric oxidase, the glycolysis of hexosediphosphate (slight inhibition), acetate thiokinase, sulfanilamid transacetylase, pyruvic decarboxylase from yeast, arginase, xanthine oxidase, and D-amino acid oxidase.

Der Firma Dr. Karl Thomae, Biberach Riss, danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

Herrn Dr. FORSTER, Firma Mack Illertissen sind wir für die Überlassung von Cytochrom c, dem Zellstoffwerk Waldhof für die Unterstützung mit ATP zu Dank verpflichtet.

Literatur

[1] DRUEY, J., u. G. OESTERHELD: Helvet. chim. Acta **25**, 753 (1942). — [2] ERNSTER, L., O. LINDBERG and H. LÖW: Nature (Lond.) **175**, 168 (1955). — [3] EXER, B.: Experientia (Basel) **12**, 294 (1956). — [4] GAUDIN, G.: Rev. Rheum. **23**, 25 (1956). — [5] GREEN, D. E., W. F. LOOMIS and V. H. AUERBACH: J. of Biol. Chem. **172**, 389 (1948). — [6] HILLER, J.: Z. exper. Med. **126**, 244 (1955). — [7] HUNTER, jr., E. F., and L. FORD: J. of Biol. Chem. **216**, 357 (1955). — [8] HOLZER, H.: persönliche Mitt. — [9] KALCKAR, H. M.: J. of Biol. Chem. **167**, 461 (1947). — [10] KAPLAN, N. O., and F. LIPMANN: J. of Biol. Chem. **174**, 37 (1948). — [11] KAY, W. W., and M. A. H. REID: Biochemic. J. **28**, 1798 (1934). — [12] LANG, K.: Klin. Wschr. **1939**, 913. — [13] LANG, K., u. C. KELLER: Biochem. Z. **327**, 202 (1955). — [14] LANG, K., G. SIEBERT, S. LUCIUS u. H. LANG: Biochem. Z. **321**, 538 (1951). — [15] OCHOA, S., A. H. MEHLER and A. KORNBERG: J. of Biol. Chem. **174**, 979 (1948). — [16] SCHNEIDER, W. C.: J. of Biol. Chem. **176**, 259 (1948). — [17] SEDLMAYR, G., A. KEMNITZ u. H. HOLZER: Klin. Wschr. im Druck. — [18] KERSTEN, H., u. HJ. STAUDINGER: Klin. Wschr. **1956**, 523. — [19] STOESZ, P. A., and G. A. LEPAGE: J. of Biol. Chem. **180**, 587 (1949).

Professor Dr. Dr. K. LANG und Dr. med. K. H. BÄSSLER,
Mainz, Physiologisch-chemisches Institut der Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 580—587 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Renale Phosphatausscheidung bei Infusion von Fructosediphosphat am Hund*

Von
R. Taugner, E. Schmid, M. v. Bubnoff**, H. Hochrein und F. Dorschner

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. September 1956)

Bestimmte Phosphorsäureester können bei der narkotisierten Katze — neben der Filtration — auch noch tubulär ausgeschieden werden. Während der Infusion von organischem Phosphat kommt es außerdem zu einer besonders hohen, die Filtration übertreffenden Ausscheidung von Orthophosphat (OP, vergl. Taugner, v. Bubnoff u. Braun). Zur weiteren Aufklärung des Schicksals der säurelöslichen organischen Plasmaphosphatfraktion wurden nun auch Clearanceversuche an nicht narkotisierten Hunden vorgenommen. Als Modellsubstanz diente dabei Fructose-1,6-Phosphat (FP), das bei der Katze zu einer besonders deutlichen tubulären Ausscheidung geführt hatte und nach unveröffentlichten papierchromatographischen Versuchen einen wesentlichen Anteil dieser Fraktion darstellt.

Methodik

Die Anordnung entsprach der früherer Versuche mit OP (Taugner, Schmid, v. Bubnoff, Hochrein u. Dorschner). Die auch damals schon verwendeten 3 Hunde erhielten Na-FP-Infusionen mit 150—1050 mg-% P. Nach papierchromatographischen Kontrollen enthielt das von der Firma Dr. G. Henning, Berlin-Tempelhof, freundlicherweise zur Verfügung gestellte Präparat neben FP nur etwa 2% OP-P. Das nach Fiske u. Subbarow im Urin erfaßte organische Phosphat bestand in derartigen Kontrollen bei Plasmaspiegeln über 3 mg-% überwiegend aus FP; da die — vor allem für das Plasma — umständliche Papierchromatographie nicht routinemäßig verwendet werden konnte, sind die entsprechenden Werte im folgenden jedoch als „organisches Phosphat" (OrP) aufgeführt.

Durch Ultrafiltration mit anschließender Dialyse an Zellophansäcken wurde geprüft, ob wesentliche Anteile des Plasmaphosphats an Plasmaeiweiß gebunden sind. Der Filtrationsdruck lag bei etwa 150, der CO_2-Partialdruck bei 50 mm Hg. Die Temperatur wurde zur Einschränkung der hydrolytischen Spaltung von FP während Ultrafiltration und Dialyse auf 4° C eingestellt.

---

* Eine vorläufige Mitteilung der Ergebnisse erfolgte auf der 22. Tagung der Dtsch. Pharmakol. Gesellsch., Graz, 5.—7. Sept. 1955.

** Stipendiat der Dt. Forschungsgemeinschaft.

Ergebnisse

In Abb. 1 ist oben der *Orthophosphat*-Spiegel bei Infusion von FP gegen den Quotienten $\frac{\text{Clearance Orthophosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$ aufgetragen. Letzterer scheint sich bei steigender OP-Konzentration — wie sie im Plasma durch die Hydrolyse von FP entsteht — asymptotisch dem Wert 1,0 zu nähern. Der Kurvenverlauf entspricht im wesentlichen dem bei langsamer Infusion von OP (vgl. TAUGNER u. Mitarb. 1956, Abb. 1). Ähnliche

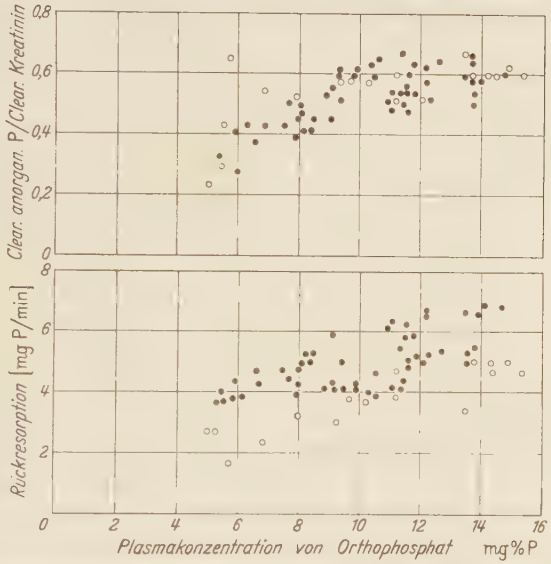


Abb. 1. Nierenausscheidung von anorganischem Phosphat bei Infusion von Fructose-1,6-Phosphat (Hund Hella • und Hund Bibela ○). Oben: Quotient $\frac{\text{Clearance anorganisches Phosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$, unten: Rückresorption von anorganischem Phosphat in Abhängigkeit von der Orthophosphatkonzentration im Plasma

Übereinstimmungen mit den Ergebnissen bei langsamer OP-Zufuhr lassen sich aus dem Verhalten der Rückresorption ablesen (Abb. 1 unten).

Die Ausscheidung des *organischen Phosphats* verlief bei den einzelnen Hunden verschieden. Beim 1. Tier stieg das Verhältnis $\frac{\text{Clearance organisches Phosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$ mit zunehmendem Phosphatangebot nur wenig steiler an als der Quotient $\frac{\text{Clearance Orthophosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$; der Kurvenverlauf läßt nicht erwarten, daß die Clearance des OrP die von Kreatinin bei weiterer Erhöhung des Esterspiegels übertreffen würde (Abb. 2 oben). Die Rückresorption nahm mit dem OrP-Spiegel innerhalb des untersuchten Bereichs annähernd linear zu (Abb. 2 unten).

Beim 2. Tier stieg das Verhältnis $\frac{\text{Clearance organisches Phosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$ wesentlich rascher an; die Kreatinin-Clearance wurde von der OrP-Clearance bei Plasmakonzentrationen von 10—14 mg-% sogar in einigen Perioden um den Faktor 1,2—1,35 übertroffen (Abb. 3). Die Streuungen waren innerhalb der einzelnen Versuche wesentlich geringer; sie beruhen zum Teil auch nur darauf, daß der Quotient $\frac{\text{Clearance organisches Phosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$ bei längerer Versuchsdauer trotz weiterer Erhöhung der Plasmakonzentration etwas abnahm (Tab. 1 A). In Abb. 4 fällt auf, daß die errechnete OrP-Filtration bei den oben erwähnten höheren Plasmakonzentrationen von der Urinausscheidung übertroffen wird. Beim 3. Tier betrugen die höchsten, bei Plasmaspiegeln von 14 mg-% erreichten Werte des Quotienten $\frac{\text{Clearance organisches Phosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$ etwa 1,25.

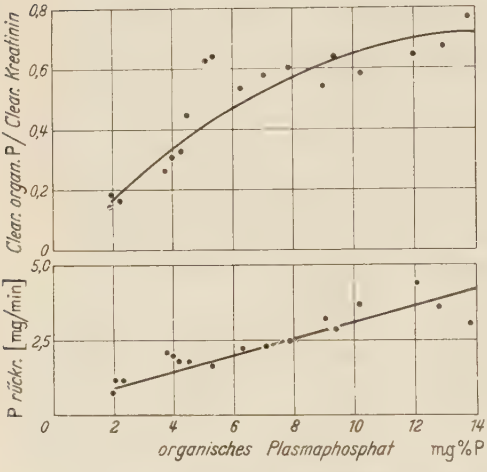


Abb. 2. Quotient $\frac{\text{Clearance organisches Phosphat}}{\text{Clearane Kreatinin}}$ (oben), bzw. Rückresorption von organischem Phosphat (unten) in Abhängigkeit von der Plasmakonzentration von organischem Phosphat beim ersten Tier (Bibela)

Nach Tab. 1 B war die OrP-Clearance des 2. Tieres bei fallender Plasmakonzentration wesentlich größer als bei steigendem Plasmaspiegel. Ähnliche, allerdings weniger deutliche Beobachtungen wurden nur noch beim 3. Hund gemacht. 1 Jahr später waren die Unterschiede auch beim 2. Tier geringer.

Nach Schmid u. Mitarb. wird die Ausscheidung der Phosphatester durch OP nicht verändert. Es wurden nun auch die Einflüsse von Fructose auf die OrP-Ausscheidung geprüft. Wir stellen dazu den OrP-Spiegel auf 6—7 mg-% ein und infundierten nach 4 Kontrollperioden zusätzlich 5 cm³ einer 25%igen Fructoselösung/min. Der Fructosespiegel stieg dabei weit über den zur Sättigung des Rückresorptionsmechanismus erforderlichen Wert an. Die Ausscheidung des OrP wurde dadurch nicht beeinflußt.

Die Ultrafiltrationsversuche — an Plasma von 2 Hunden durchgeführt — sprachen gegen das Vorliegen wesentlicher Mengen von eiweißgebundenem OrP. Sie waren allerdings bei OrP-Spiegeln unter 5 mg-% nicht verwertbar, da endogenes organisches Phosphat, Bestimmungsfehler

und die nicht vollständig auszuschließende Hydrolyse in diesem Bereich allzu sehr störten. Bei Plasmakonzentrationen über 5 mg-% waren lediglich 5—10% des organischen Plasmaphosphats nicht ultra-

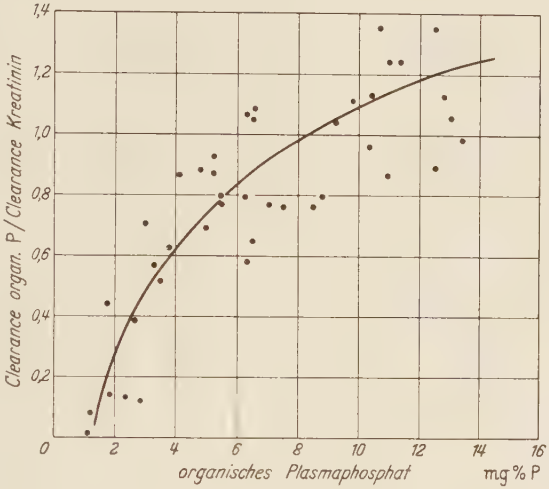


Abb. 3. Quotient $\frac{\text{Clearance organisches Phosphat}}{\text{Clearance Kreatinin}}$ in Abhängigkeit von der Plasmakonzentration von organischem Phosphat beim zweiten Tier (Hella)

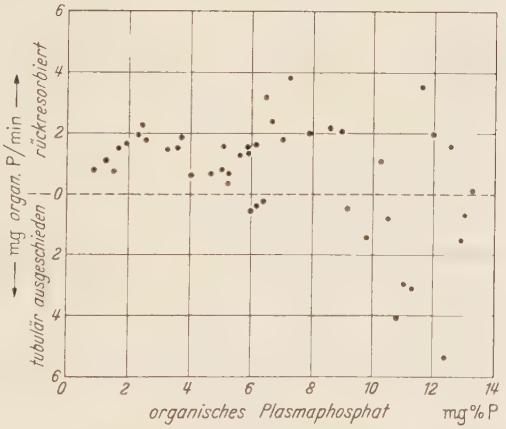


Abb. 4. Rückresorbiertes bzw. tubulär ausgeschiedenes organisches Phosphat in Abhängigkeit von der Plasmakonzentration beim zweiten Tier (Hella)

filtrierbar. Es wurde daher auf Korrekturen verzichtet. Das OP fand sich bei den hier interessierenden Konzentrationen vollständig im Ultrafiltrat wieder.

Tabelle 1

A. Filtration, Rückresorption und Ausscheidung von anorganischem und organischem Phosphat bei Infusion von Fructosediphosphat

Zeit min	Diurese cm³/min	Kreat. Clear. cm³/min	Orthophosphat-P				Clear. anorg. P / Clear. Kreat.	Fructosediphosphat-P				Clear. org. P / Clear. Kreat.
			Plasma-P mg-%	Filtriert mg/min	Ausgeschieden mg/min	Rückresorbiert mg/min		Plasma-P mg-%	Filtriert mg/min	Ausgeschieden mg/min	Rückresorbiert bzw. tubul. ausgeschied. mg/min	
Hella, 25 kg												
ab 45 Infusion einer Lösung mit etwa 750 mg-% P, 5 cm³/min												
75— 84	11,7	107	9,0	9,61	5,3	4,31	0,55	9,1	9,7	10,1	+ 0,4[1]	1,03
84— 94	9,28	104	9,8	10,2	6,11	4,1	0,6	9,8	10,2	11,4	+ 1,2	1,1
94—104	5,22	103	10,5	10,82	6,93	3,87	0,64	10,5	11,05	11,8	+ 0,75	1,11
ab 104 Infusion einer Lösung mit etwa 800 mg-% P, 5 cm³/min												
124—134	7,92	108	11,3	12,2	7,95	4,25	0,66	11,3	12,1	15,0	+ 2,9	1,23
134—144	10,02	116	11,7	13,55	8,34	5,2	0,615	11,0	12,8	15,6	+ 2,8	1,23
144—154	9,82	113	12,1	13,65	8,35	5,3	0,61	10,7	12,0	16,0	+ 4,0	1,34
ab 154 Infusion einer Lösung mit etwa 900 mg-% P, 5 cm³/min												
169—179	7,9	116	12,6	14,6	9,25	5,35	0,63	12,4	14,0	19,4	+ 5,4	1,34
179—189	8,6	114	13,3	15,5	9,96	5,54	0,64	12,9	14,7	16,0	+ 1,3	1,11
189—199	8,48	114	14,6	16,65	9,76	6,9	0,59	13,4	15,2	15,0	0,2	0,965

[1] + = tubuläre Ausscheidung von organischem Phosphat.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

B. Filtration, Rückresorption und Ausscheidung von anorganischem und organischem Phosphat bei steigender und fallender Plasmakonzentration von Fructosediphosphat

Zeit min	Diurese cm³/min	Kreat. Clear. cm³/min	Orthophosphat-P				Clear. anorg. P / Clear. Kreat.	Fructosediphosphat-P				Clear. org. P / Clear. Kreat.
			Plasma-P mg-%	Filtriert mg/min	Ausgeschieden mg/min	Rückresorbiert mg/min		Plasma-P mg-%	Filtriert mg/min	Ausgeschieden mg/min	Rückresorbiert bzw. tubul. ausgeschied. mg/min	
Hella, 25 kg												
71— 88	Infusion einer Lösung mit etwa 600 mg-% P, 5 cm³/min											
88—135	Infusion einer Lösung mit etwa 650 mg-% P, 5 cm³/min											
ab 135	Infusion einer Lösung mit etwa 750 mg-% P, 5 cm³/min											
150—161	9,5	119	13,6	16,2	7,11	9,19	0,48	11,9	14,2	12,1	2,1	0,84
161—171	7,7	111	13,8	15,3	8,64	6,66	0,56	12,5	13,9	12,2	1,7	0,88
171—181	7,4	116	14,0	16,25	9,28	7,0	0,57	13,0	15,0	15,5	+ 0,5[1]	1,04
ab 181	Infusion isotonischer Kochsalzlösung ohne Fructosediphosphat, 5 cm³/min											
201—209	6,95	120	13,35	15,95	9,25	6,7	0,58	1,15	1,39	3,72	+ 2,33	2,7
209—216	7,08	121	12,1	14,65	8,2	6,45	0,56	1,6	1,92	1,78	0,17	0,92
216—226	6,45	121	11,35	13,6	7,33	6,27	0,53	1,6	1,95	0,84	1,11	0,43

[1] + = tubuläre Ausscheidung von organischem Phosphat.

Diskussion

Die Kreatininclearance des Hundes wird bei Infusion von FP in keinem Fall von der OP-Clearance übertroffen; die OP-Clearance stimmt hier sogar weitgehend mit der bei langsamer Infusion von OP überein. FP führt demnach beim Hund — im Gegensatz zu früheren Ergebnissen an Katzen — nicht zu einer besonders hohen, über die OP-Filtration hinausgehenden Ausscheidung von anorganischem Phosphat. Diese Diskrepanz kann durch das verschiedene Verhalten der Tubuli beider Species, aber auch dadurch erklärt werden, daß die Katze als einziges Säugetier auch in den Glomerula Phosphatasen aufweist (vgl. Wilmer; Taugner u. Mitarb. 1953); durch diese könnte ein Teil des Esterphosphats während der Filtration bzw. beim Durchfluß durch die Glomerula gespalten werden. Auf diese Weise würde zusätzliches, bei Berechnung der filtrierten OP-Menge nicht erfaßtes OP in den Primärharn gelangen.

Gleichmäßige und relativ niedrige Rückresorptionswerte sind beim Hund nur durch langsame OP-Infusion zu erzielen (Taugner u. Mitarb., 1956). Da die Hydrolyse des infundierten FP die OP-Konzentration innerhalb von 30 min höchstens um 8—9 mg-% steigerte und „überhöhte" Rückresorptionswerte nicht vorkamen, scheint die gleiche Beziehung zwischen OP-Rückresorption und Zunahme des OP-Spiegels auch bei Infusion von FP zu bestehen.

Die Clearance des OrP war bei einem Hund kleiner als die von Kreatinin. Sie übertraf bei einem weiteren die von Kreatinin um Werte, die außerhalb der Fehlerbreite liegen. OrP scheint demnach bei einzelnen Tieren nur rückresorbiert, bei anderen außerdem auch noch tubulär ausgeschieden zu werden.

Es ist allerdings auch möglich, daß die tubuläre Ausscheidung von der Rückresorption übertroffen und daher verdeckt wird. Derartige quantitative Unterschiede wären eher verständlich als das ungewöhnliche Fehlen eines Transportvorganges in einzelnen Clearanceperioden oder bei bestimmten Tieren. Möglicherweise spielten Rasse- und Altersunterschiede unserer Hunde eine Rolle: Das zweite Tier (Dobermann, rasche OrP Ausscheidung) zählte zur Zeit der Versuche 3, das erste (Schäferbastard, niedrige OrP-Clearance) wahrscheinlich über 8 Jahre.

Ein gleichzeitiges Vorkommen von Rückresorption und tubulärer Ausscheidung ist tatsächlich schon für Kalium, Carinamid, Sulfonamide und Salicylsäure vermutet worden (Berliner u. Mitarb.; Mudge u. Mitarb.; Bjørneboe u. Mitarb.; vgl. auch H. W. Smith). Das jeweilige Ausmaß der gegenläufigen Prozesse läßt sich in solchen Fällen allerdings (wie auch bei FP) wegen der Überschneidung von Rückresorption und tubulärer Ausscheidung nicht angeben. Der eigenartige, in Abb. 4 dargestellte Zusammenhang zwischen Plasmakonzentration und tubulärem Transport von OrP ließe sich daher auf verschiedene, im einzelnen jedoch nicht zu beweisende Art erklären.

Die Beobachtung, daß die Clearance von OrP bei fallender Plasmakonzentration größer sein kann als bei fortlaufender Infusion, spricht — im Gegensatz zum Verhalten anderer tubulär ausgeschiedener Stoffe — mit einiger Wahrscheinlichkeit für eine tubuläre Speicherung von OrP. Da dieser Effekt beim zweiten Tier mit hoher OrP-Clearance besonders deutlich war und abnahm, als die tubuläre Ausscheidung zurückging, könnte sogar ein Zusammenhang zwischen Speicherung und tubulärer Exkretion angenommen werden. Bei allen diesen Überlegungen sind allerdings die

nicht exakt erfaßbaren Einflüsse des toten Raumes zu beachten, der bei steigenden Plasmaspiegeln kleinere, bei fallenden größere Clearancewerte vortäuscht.

Die tubuläre Ausscheidung von OrP wird bei der Katze — im Gegensatz zu der von PAH, Diodrast u. a. — durch Dinitrophenol nicht vermindert; die gleichzeitige Infusion von PAH-Mengen, die zur Sättigung des klassischen Transfersystems führen, beeinträchtigt die OrP-Clearance ebenfalls nicht (Taugner, Braun u. Hartenstein). Die Esterphosphatausscheidung wird andererseits durch OP und Fructose nicht deutlich beeinflußt. Damit scheint erwiesen, daß die tubuläre Ausscheidung und Rückresorption von OrP über besondere, von den erwähnten Transportvorgängen unabhängige Mechanismen abläuft.

Die bei der Katze und einzelnen Hunden im Vergleich zu OP und Fructose besonders rasche Ausscheidung von OrP führt zu der Frage, ob wirksamere renale Ausscheidungsmechanismen auch für die bei Entgiftungsvorgängen entstehenden Ester der Schwefel-, Essig- bzw. Glucuronsäure vorhanden sind. Aus den Befunden mit Paraaminobenzoesäure, Novocain und Sulfonamiden (Acetylierung, Terp; vgl. auch H. W. Smith) sowie Phloridzin (Glucuronsäure-Koppelung, Braun u. Lotspeich) scheint tatsächlich das gleiche hervorzugehen wie aus unseren Versuchen mit Triose- und Hexosephosphaten. Nach Sperber gilt ähnliches für einige Phenol-Schwefelsäureester beim Huhn sowie für Phenylsulfat bei der Ziege. Letzteres wird vom Hund allerdings nicht tubulär ausgeschieden (Taugner, Hochrein, v. Bubnoff u. Gillissen). Es dürfte daher verfrüht sein, aus diesen Ergebnissen allgemeine Aussagen über den Zusammenhang zwischen Esterbildung und Affinität zu bestimmten Transfersystemen, vor allem für die tubuläre Ausscheidung, ableiten zu wollen.

Zusammenfassung

Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen an Katzen führt die Infusion von Fructose-1,6-Phosphat beim Hund nicht zu einer besonders hohen, die Filtration übetreffenden Ausscheidung von Orthophosphat.

Fructosediphosphat selbst kann aber — wie bei der Katze — auch von den Nieren einzelner Hunde tubulär ausgeschieden werden.

Literatur

Berliner, R. W., and T. J. Kennedy: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **67**, 542 (1948). — Bjørneboe, M., S. Dalgaard-Mikkelsen u. F. Raaschou: Scand. J. clin. Laborat. Investig, **1**, 287 (1949). — Braun, W., u. W. D. Lotspeich: Persönliche Mitteilung. — Fiske, C. H., and Y. Subbarow: J. of Biol. Chem. **66**, 376 (1925). — Mudge, G. H., J. Foulks and A. Gilman: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **67**, 545 (1948). — Schmid, E., H. Ganz, W. Braun u. R. Taugner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 452 (1955). — Smith, H. W.: The Kidney, New York 1951. — Sperber, I.: Scand. J. clin. Laborat. Investig. **1**, 345 (1949). — Taugner, R., W. Braun u. H. Hartenstein: Unveröffentlicht. — Taugner, R., M. v. Bubnoff u. W. Braun: Pflügers Arch. **258**, 133 (1953). — Taugner, R., H. Hochrein, M. v. Bubnoff u. J. Gillissen: in Vorbereitung. — Taugner, R., E. Schmid, M. v. Bubnoff, H. Hochrein u. F. Dorschner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **229**, 242 (1956). — Terp, P.: Acta pharmacol. et toxicol. **7**, 259 (1951). — Wilmer, H. A.: Arch. of Path. **37**, 227 (1944).

Dr. R. Taugner, Pharmakologisches Institut der Universität, Heidelberg

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 229, S. 588—596 (1956)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. Dr. Ludwig Heilmeyer)

Untersuchungen über intrarenale Vasomotorik der neugeborenen und jugendlichen Maus

Von
Günther v. Ehrenstein und Joachim Frey

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. August 1956)

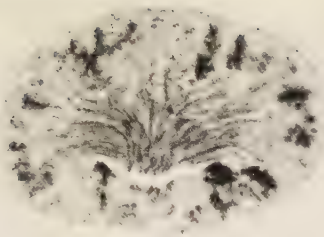
Über die morphologische und funktionelle Unterentwicklung der neugeborenen menschlichen und tierischen Nieren, die noch einige Zeit nach der Geburt nachweisbar bleibt, unterrichten mehrfache Untersuchungen (R. A. McCance, Literaturübersicht bei G. v. Ehrenstein). Es ergibt sich, daß die Ausscheidungskraft der Neugeborenen-Nieren im Vergleich zu derjenigen des erwachsenen Individuum kleiner ist, wie z. B. die Clearances von Eigen- (Harnstoff, Kreatinin) und Fremdstoffen (Inulin, Hippurat, Diodrast) zeigen. Vor allem läßt sich auch erkennen, daß der Harn eine geringere Gesamtkonzentration aufweist.

Es erhob sich deshalb die Frage, ob die Durchblutungsbilder, die für die Arten der Harnabsonderung als charakteristisch gefunden wurden (E. u. J. Frey, S. 79—108) annähernd Aufschluß geben könnten auch über den Funktionszustand der Neugeborenen-Nieren und über die Ansprechbarkeit des Organpaars auf Reize, die es zur Konzentrationsarbeit veranlassen sollen.

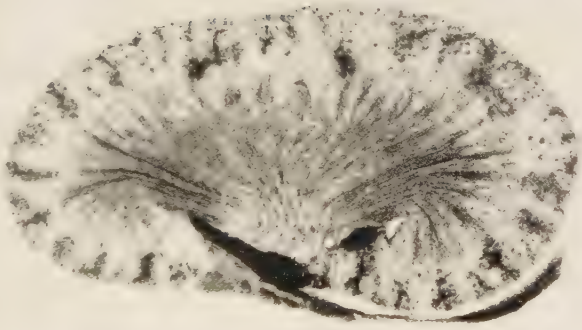
Methodisch wurde so gearbeitet, daß neugeborene weiße Mäuse bis zu einem Alter von 36 Tagen untersucht wurden (ausgeführt in den Jahren 1953/54). Die Darstellung des Gefäßinhalts der Nieren geschah mit Benzidin (T. Sjöstrand), womit die intrarenale Vasomotorik beurteilt werden kann und Durchblutungsbilder gewonnen werden, die als Äquivalente für bestimmte Funktionszustände der Nieren angesehen werden können. Untersucht wurden insgesamt 147 Tiere. Zur Erzielung einer Konzentrierung des Harns wurde entweder eine 5–12stündige Hunger- und Durstperiode vorausgeschickt oder man verabfolgte $^1/_4$ Std vor der Tötung (Nackenschlag) eine subcutane Injektion von 0,001 oder 0,0001 V.E. Hypophysin „Bayer" pro Gramm Maus.

Ergebnisse

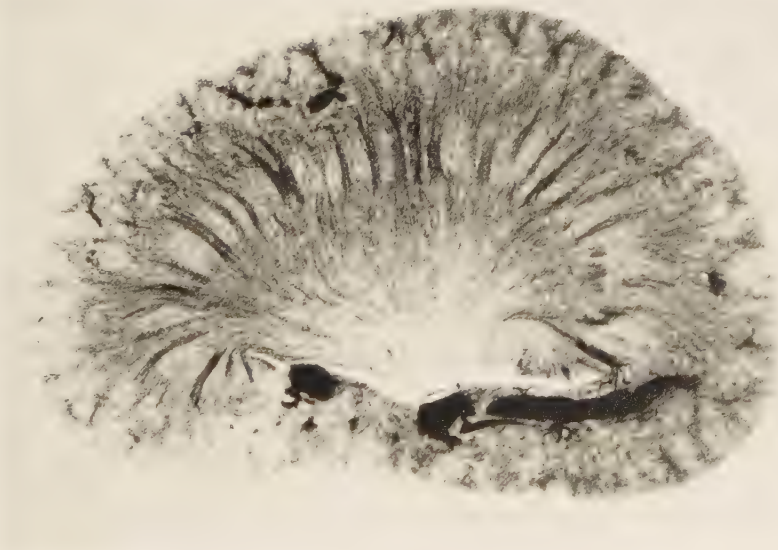
a) Kontrollserie (16 Tiere). Mäuse bis zu 32 Tagen Lebensalter weisen renale Durchblutungsäquivalente auf, die einer Filtrationsdiurese (J. Frey, S. 113) entsprechen. Die Durchblutung aller Gefäßprovinzen ist gut, vor allem besteht an der Rinde-Markgrenze kein scharfer Absatz der



2 Tage alt



10 Tage alt



15 Tage alt

Abb. 1. Mit zunehmender Reifung der Neugeborenen-Niere (Maus) nimmt die capilläre Durchblutung zu. Die intrarenale Vasomotorik weist die Eigentümlichkeiten einer Filtrationsdiurese auf

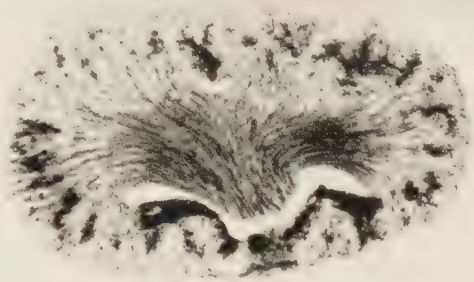
Blutfülle, wie er bei konzentrierenden Nieren zu sehen ist. Diese Funktionsart der Nieren läßt sich bis 3—4 Wochen nach der Geburt nachweisen (Abb. 1).

b) 0,0001 V. E. Hypophysin subcutan pro g Maus (49 Tiere von 1 bis 32 Tagen Lebensalter). Die Durchblutungsbilder zeigen bis zu einem Alter von 12—15 Tagen, wo die Tiere die Augen öffnen und festes Futter zu fressen beginnen, also „abgestillt" werden, ebenfalls die charakteristischen Zeichen, wie sie bei Filtrationsdiuresen gefunden werden. Von einem Lebensalter von 12—15 Tagen ab sieht man jetzt zunehmend die Merkmale der Harnkonzentrierung, wobei in der Übergangszeit Mischbilder zustande kommen.

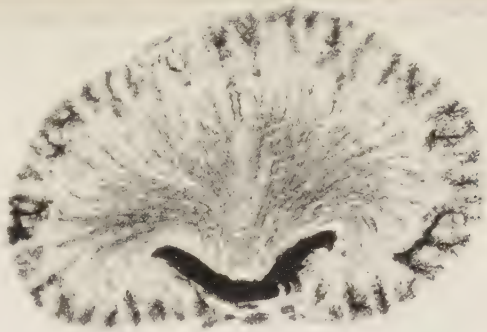
c) 0,001 V. E. Hypophysin subcutan pro g Maus (27 Tiere). Auch bei dieser stärkeren Hypophysindosis findet sich grundsätzlich das gleiche Verhalten: Filtrationsdiurese bis zur Zeit des Abstillens. Vom Ende der 2. Lebenswoche an (Öffnung der Augen) setzt sich mehr und mehr das Durchblutungsbild der Wassereinsparung, der Harnkonzentrierung, durch. Die Abb. 2 gibt hierfür Beispiele. Entsprechend der höheren Hormondosis läßt sich eine Neigung zu Gefäßkonstriktionen erkennen, was auch an der blasseren Nierenoberfläche sichtbar wird (im Vergleich zum Verhalten bei einer zehnfach kleineren Hypophysindosis).

d) Nachdem der hormonelle Reiz zur Harnkonzentrierung nur bei älteren Jungtieren typische, für diese Harnkonzentrierung eigentümliche Bilder der intrarenalen Durchblutung lieferte, wie sie sich auch bei erwachsenen Tieren zeigen (E. u. J. Frey), wurde der Einfluß des physiologischen Reizes zur Herstellung eines hochgestellten, also hochkonzentrierten Harns dadurch erreicht, daß die von der Mutter getrennten Jungtiere keine Flüssigkeit erhielten und infolge gleichzeitigen Hungerns auch kein Oxydationswasser aus Nahrungsmitteln beziehen konnten. Die Hunger-Durstperiode dauerte 5—12 Std, eine Zeitspanne, die je nach dem Lebensalter bei dem labilen Wasserstoffwechsel der Jungtiere ausreichte, einen mehr oder minder starken Reiz zur Wassereinsparung durch die Nieren zu setzen. Hierbei fiel beim Vergleich mit der höheren Hypophysindosis (Abschnitt c) ebenfalls die Blutarmut von Rinde und Mark der Nieren auf, obwohl allgemein die Eigentümlichkeiten einer Filtrationsdiurese vorlagen. In dieser Versuchsserie ließ sich ein Ablauf der Durchblutungsbilder je nach den Tagen des Lebensalters finden: von uncharakteristischem Gefäßverhalten kurz nach der Geburt über das der Filtrationsdiurese bis zum typischen Bild der Harnkonzentrierung, die vom 13. Lebenstag an erkennbar wird. Die Serie der Abb. 3 illustriert die gefundenen Bedingungen in Abhängigkeit vom Alter der Jungtiere (55 Tiere).

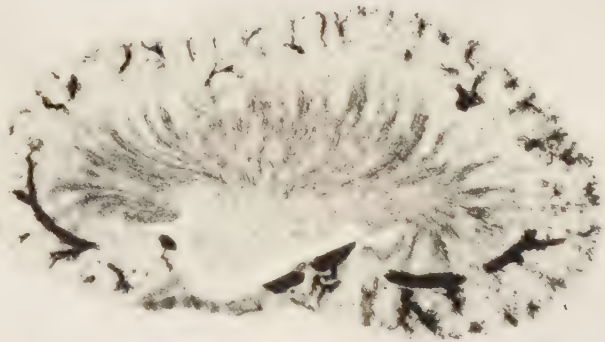
Es sei bemerkt, daß neugeborene und junge Tiere unter den Bedingungen des Hungerns und Durstens außer einer durch Gefäßkonstriktion hervorgerufenen



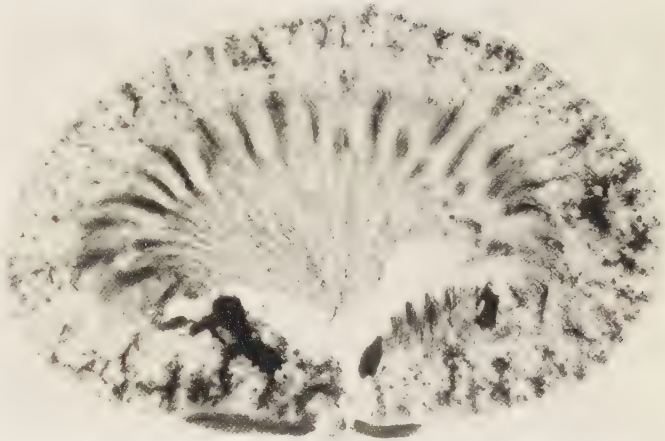
4 Tage alt



8 Tage alt



12 Tage alt



22 Tage alt

Abb. 2. Erst von der Zeit des Augenöffnens an (12.—15. Lebenstag) wird der Reiz zur Harnkonzentrierung (0,0001 und 0,001 V. E. Hypophysin prog Maus) wirksam: es erscheint an der Mark-Rindengrenze eine Zone geringer capillarer Durchblutung (vgl. hierzu Abb. 1)

Abb. 3. Der Reiz zur Harnkonzentrierung wird bei dieser Versuchsserie durch Hungern und Dursten erreicht: Auftreten der für diese Art der Harnbildung eigentümlichen capillären Durchblutung der Niere mit sehr deutlicher Markierung der Mark-Rindengrenze

Blässe der Haut eine pralle Füllung von Magen und Harnblase zeigten, obwohl nichts aufgenommen wurde. Diese Befunde weisen darauf hin, daß es unter den gewählten Versuchsbedingungen bei den jugendlichen Tieren zu einer Ausschüttung von Hypophysenhinterlappenhormon gekommen war.

e) Schließlich war es von Interesse, etwas über die osmolare Konzentration des Harns nach Hypophysininjektion zu erfahren. Hierzu dienten 7 neugeborene Mäuse eines Wurfs, deren Blasenharn abgedrückt und in einer Portion gesammelt kryoskopiert wurde. Im Alter von 4 Tagen war die Gefrierpunktsdepression des Harns —0,74 und —0,72° C, lag also nur wenig über der des Bluts. Einen Tag später (5 Tage alt) wurde 0,0001 V. E. Hypophysin s. c. pro Gramm Tiergewicht injiziert; die Harnkonzentration von —0,74° C vor der Hypophysingabe wurde bis 10 Std post inject. nicht überschritten: Δ —0,74; —0,72; —0,72 und —0,74° C. Am 6. Lebenstag wurden 0,001 V. E./g injiziert; diese größere Hormongabe war von einer Anurie gefolgt, indem sich bei 2 Tieren die mit Harn gefüllte Blase nicht auspressen ließ, bei den übrigen 5 Tieren weder eine gefüllte Blase tastbar noch Harn zu erhalten war. Im Alter von 8 Tagen gefror der Harn wieder bei —0,74° C. Die Bestimmung der osmolaren Harnkonzentration bestätigt also den aus den Gefäßbildern gezogenen Schluß, daß bei neugeborenen Mäusen die Nieren nicht auf einen Reiz zur Harnkonzentrierung (Hypophysininjektionen) reagieren, sondern ihre Hyposthenurie beibehalten.

Besprechung der Ergebnisse

Nach den Durchblutungsäquivalenten läßt sich die Art der Harnabscheidung der neugeborenen Mäuse bis zu einer Zeit des Abstillens, wo die Tiere die Augen öffnen und beginnen, feste Nahrung aufzunehmen, in Form einer Filtrationsdiurese klassifizieren. Dies könnte man mit einer alleinigen Aufnahme von Milch, die in ihrer Gesamtkonzentration der des Bluts nahekommt, erklären: den Nieren wird damit eine Summe von Substanzen angeboten, unter denen sich viel Wasser und relativ viel NaCl befindet. Allerdings entspricht der Gehalt der Milch an Na und Cl keinesfalls dem des Bluts, sondern ist viel geringer. Es kann demnach bei ausschließlicher Ernährung des Säuglings mit Milch nicht das Angebot einer blutgleichen Flüssigkeit an die Nieren den Anlaß zur Filtrationsdiurese abgeben, wie es z. B. für die Mobilisation von Ödemen zutrifft. Der Grund muß vielmehr anderweitig gesucht werden.

Für die nähere Einsichtnahme in diese Besonderheiten der Harnabscheidung des Neugeborenen ist die Tatsache von Wichtigkeit, daß beim erwachsenen Tier während der Dauer einer Filtrationsdiurese ein Reiz zur Harnkonzentrierung mehr oder minder unwirksam wird, und umgekehrt, daß bei simultaner Verabfolgung von Substanzen, die einerseits eine Harnkonzentrierung (z. B. Hypophysin), andererseits eine Filtrationsdiurese (z. B. Purinkörper, Harnstoff) auslösen, sich der Reiz

zur Filtrationsdiurese stets durchzusetzen vermag (J. Frey, S. 94—98). Da nach den hier beschriebenen Untersuchungen die Nieren des Neugeborenen bis zur Zeit des Abstillens nach Art der Filtrationsdiurese arbeiten, war zu prüfen, ob sie sich ähnlich wie die des Erwachsenen halten, ob sie also den Reiz zur Harnkonzentrierung unbeantwortet lassen. Das ist in der Tat nach den Untersuchungen über die intrarenale Gefäßvasomotorik nachzuweisen: bis zu einem Alter von durchschnittlich 15 Tagen war sowohl nach Hypophysininjektionen (Versuchsserie b und c) als auch nach Nahrungs- und Flüssigkeitskarenzierung (Versuchsserie d) aus den renalen Durchblutungsbildern abzulesen, daß diese Reize unwirksam geblieben sind. Auch Bestimmungen der Gesamtkonzentration des Harns nach subcutaner Injektion von 0,0001 V. E. Hypophysin pro Gramm Tiergewicht ergaben am 5. Lebenstag eine Gefrierpunktsdepression von —0,72 bis —0,74° C wie vorausgehend und einige Tage danach. Demnach kann von Tieren dieser Altersstufe kein Harn zur Abscheidung gelangen, dessen Gesamtkonzentration wesentlich über der des Bluts liegt. Es sei bemerkt, daß die Gefäßbilder der Hypophysinserien und diejenigen nach Hungern und Dursten fast identisch waren, wodurch auch die Richtigkeit der Methoden bestätigt wird. Vor allem erscheint die Verfahrensweise zur Beurteilung von Funktionszuständen der Nieren für den Kenner der Materie als recht zuverlässig; die von uns gefundenen Resultate stimmen mit denjenigen der Literatur vollständig überein oder können sie teilweise erläutern.

Besonders finden die Ergebnisse von H. Heller eine Bestätigung und eine weitere Interpretation. Von diesem Autor wurde ermittelt, daß die Hypophyse des Neugeborenen zwar viel weniger antidiuretisches Hormon enthält als die des Erwachsenen, diese Hormonmenge aber immerhin noch so ausreichend ist, um eine Harnkonzentrierung zustande zu bringen, wenn das Hormon nur ausgestoßen würde bzw. die Niere darauf reagieren könnte. Nach den vorliegenden Ergebnissen über die intrarenale Vasomotorik des Neugeborenen spricht vieles dafür, daß diese Nieren nicht auf antidiuretisches Hormon reagieren, auch wenn es von der Posthypophyse ausgeschieden wird. Diese unsere Ansicht harmoniert mit derjenigen von H. Heller, der bei Säuglingen trotz Injektion von antidiuretischem Hormon eine Harnkonzentrierung vermißte. Daß unter den Bedingungen der Flüssigkeits- und Nahrungskarenz aber posthypophysäre Hormone ausgeschieden werden, konnte aus den Spasmen der Gefäßmuskulatur sowie denjenigen von Pylorus und Blasensphincter entnommen werden. Weiterhin wird durch unsere Befunde verständlich, daß ein erneuter Reiz zur Filtrationsdiurese bei neugeborenen Individuen wenig wirksam wird, da die Nieren sich ja bereits im Zustand dieser Diureseart befinden. Deshalb wurde nach den Untersuchungen von R. A. McCance u. E. Wilkinson nach Gabe einer 10%igen NaCl-Lösung oder einer 20%igen Harnstofflösung ebenso nur eine geringe Zunahme des Harnzeitvolumens beobachtet (neugeborene Ratte) wie sich auch das osmotische Gut des Harns nach solchen Reizen nicht oder nur geringfügig erhöhte (für die neugeborene Ratte nach R. A. McCance u. E. Wilkinson; für den menschlichen Säugling nach R. F. A. Dean u. R. A. McCance). Auf diese Weise sind auch die Ergebnisse der Arbeiten von E. Kerpel-Fronius u. Mitarb. zu erklären. Die Nieren der

jungen Individuen befinden sich physiologisch im Zustand einer mehr filtrativen Harnbereitungsart.

Der tiefere Grund für die filtrative Arbeitsweise der Neugeborenen-Niere liegt nicht in der Art des quantitativen und qualitativen Angebot von Harnfixa, sondern offensichtlich an der morphologischen und funktionellen Unreife der Nieren, speziell ihrer Epithelien. Es spricht einiges dafür, daß tatsächlich die Posthypophyse des Neugeborenen auf entsprechende Reize der Flüssigkeitsverarmung des Organismus ihre Hormone ausschüttet, daß jedoch die Nieren infolge ihrer Unreife nicht imstande sind, einen konzentrierten Harn zu sezernieren: bei Dursten zeigte sich in unseren Versuchen eine auffallende Blässe und Blutleere der Nieren sowie Spasmen des Pylorus und des Sphincters der Harnblase.

Wir kommen zu dem Schluß, daß die Nieren des Neugeborenen infolge ungenügender Ausreifung sich im Zustand einer filtrativen Harnabsonderung befinden, eine Art der Harnbereitung, die posthypophysäre Reize zur Harnkonzentrierung (antidiuretisches Hormon) paralysiert. Ceteris paribus wird dieses Ausbleiben der renalen Ansprechbarkeit auf das Hypophysenhormon auch beim Erwachsenen gefunden: bei Gabe von sogenannten Diuretica und bei bestimmten Krankheitszuständen (z. B. schrumpfenden Nierenprozessen). In jedem Fall ist dann aber eine Störung des Metabolismus der Nierenepithelien vorhanden. Es ist anzunehmen, daß bei der Neugeborenen-Niere im Vergleich zu der der Erwachsenen infolge noch bestehender Unreife eine Insuffizienz der Fermentsysteme vorliegt.

Zusammenfassung

Mittels Färbung des Gefäßinhalts durch Benzidin wurden die Nieren von 147 jugendlichen weißen Mäusen verschiedenen Alters (von der Geburt bis zu einer Lebensdauer von 32 Tagen) untersucht, um mit Hilfe der Beobachtung von Durchblutungsäquivalenten Aufschluß über ihren Funktionszustand zu erhalten.

Es zeigte sich, daß die Nieren bis zu einem Alter von durchschnittlich 14 Tagen den Funktionszustand einer Filtrationsdiurese aufweisen, der sich durch Reize zur Harnkonzentrierung (subcutane Injektion von 0,001 oder 0,0001 V. E. Hypophysin „Bayer" pro Gramm Maus oder Hungern und Dursten) nicht durchbrechen ließ. Nach einem Lebensalter von 15 Tagen, wo die Tiere die Augen öffnen und feste Nahrung aufzunehmen beginnen, erlangen jedoch die gleichen Reize zur Konzentrierung zunehmende Wirksamkeit. Untersuchungen der Gesamtkonzentration des Harns von Versuchstieren am 5. Lebenstag unter einer Hypophysindosis von 0,0001 V. E./g erweisen ebenfalls das Unvermögen der Nieren, einen konzentrierten Harn zu liefern, wie es aus den Gefäßbildern zu entnehmen war (Gefrierpunkt des Harns —0,72 bis —0,74° C).

Nach Erörterung der in Frage kommenden Möglichkeiten wird die Ansicht vertreten, daß es die morphologische und funktionelle Unreife der Nieren ist, die die fehlende Ansprechbarkeit auf das antidiuretische Hormon ausmacht, denn offenbar schüttet die Posthypophyse in dieser Versuchsreihe auf den adäquaten Reiz (Hungern und Dursten) hin das Hormon aus. Unter ähnlichen Bedingungen finden sich Parallelen zu den Nieren des erwachsenen Individuum.

Literatur

Dean, R. A. F., and R. A. McCance: Nature (Lond.) **160**, 904 (1947). — v. Ehrenstein, G.: Diss. Freiburg 1955. — Frey, E., u. J. Frey: Die Funktionen der gesunden und kranken Niere, S. 79—108; S. 113; S. 94—98. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — Heller, H.: J. of Physiol. **102**, 429 (1944); **106**, 28, 245 (1947); **108**, 303 (1949). — Heller, H., and E. Zaimis: J. of Physiol. **109**, 162 (1949). — Kerpel-Fronius, E.: Z. exper. Med. **85**, 235 (1932); **90**, 676 (1933). — Z. Kinderheilk. **51**, 400 (1932); **57**, 489 (1935). — Kerpel-Fronius, E., u. F. Leovey: Arch. Kinderheilk. **94**, 9 (1934). — McCance, R. A.: Physiologic. Rev. **28**, 331 (1948). — Amer. J. Med. **9**, 229 (1950). — McCance, R. A., and E. Wilkinson: J. of Physiol. **106**, 256 (1947). — Scapo, J., u. E. Kerpel-Fronius: Mschr. Kinderheilk. **58**, 1 (1933). — Sjöstrand, T.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **68**, 160 (1934).

Prof. Dr. J. Frey, Freiburg i. Br. Medizinische Universitäts-Klinik